



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CONSTRUCCIÓN DE ANDAMIOS DE GELATINA-ÁCIDO
HIALURÓNICO ENTRECruzADOS CON DISTINTAS
CONCENTRACIONES DE EDC
(N-(3-DIMETILAMINOPROPIL)-N-ETILCARBODIIMIDA)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ROSA MARÍA ARELLANO OLIVARES



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. KATIA JARQUÍN YÁÑEZ
MÉXICO, D. F. 2014**



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Arellano
Olivares
Rosa María
52 59 60 65
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307004297
2. Datos del Tutor
M en C
Katia
Jarquín
Yáñez
3. Dr
Andrés Eliú
Castell
Rodríguez
4. Dr
Luis Felipe
Jiménez
García
5. Dra
María Cristina
Piña
Barba
6. M en C
Miguel Ángel
Herrera
Enríquez
7. Construcción de andamios de gelatina-ácido hialurónico entrecruzados con distintas concentraciones de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcabodiimida)
57 p.
2005

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
Ingeniería de Tejidos	8
Células	9
Factores de crecimiento	10
Ciencia de Materiales	11
Biomateriales	13
ANTECEDENTES	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
METODOLOGÍA.....	28
Fabricación de andamios de gelatina-ácido hialurónico (Ge-HA).....	29
Preparación de los andamios para microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDS).....	29
Preparación de los andamios para microscopia electrónica de barrido (MEB).....	30
Capacidad de absorción	30
Esterilización de los andamios	30
Obtención y purificación de las células estromales de médula ósea.....	31
Ensayos de citotoxicidad	32
Cultivo <i>in vitro</i>	32
Pruebas estadísticas	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Composición química.....	36
Porosidad	39
Capacidad de Absorción.....	44
Citotoxicidad	45
Cultivo <i>in vitro</i>	47
CONCLUSIONES.....	49

ANEXO	51
REFERENCIAS	52

AGRADECIMIENTOS

Comité revisor de esta tesis:

- ❖ M. en C. Katia Jarquín Yáñez
- ❖ M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez
- ❖ Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
- ❖ Dra. María Cristina Piña Barba
- ❖ Dr. Luis Felipe Jiménez García

Por su tutoría y realización del trabajo:

- ❖ M. en C. Katia Jarquín Yáñez
- ❖ M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez
- ❖ Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Por contribuir en mi formación y asesoría técnica y académica:

- ❖ Biól. Beatriz Hernández Téllez
- ❖ M. en C. María Luisa del Prado Aduelo
- ❖ M. en C. Gabriela Piñón Zárate
- ❖ M en C. Jorge E. Miranda Calderón
- ❖ Dr. José Ocotlán Flores Flores
- ❖ Estudiante de Medicina Dulce María López Pérez

Por su apoyo en la liofilización:

- ❖ Dra. Gloria Gutiérrez Venegas
- ❖ Dra. María Cristina Piña Barba
- ❖ Cristina Hernández Bermúdez

Por su apoyo en la realización de la técnica de microscopía electrónica:

- ❖ Biól. Armando Zepeda Rodríguez
- ❖ Francisco Pasos Nájera
- ❖ Dr. Jesús Arenas Alatorre

Por su apoyo en la realización de cortes y tinciones histológicas:

- ❖ Técnica Académica Raquel Guerrero Alquicira

ABREVIATURAS

Ab	Antibiótico (estreptomicina, penicilina y anfotericina β)
BMP	Proteína morfogénica de hueso
BMSC	Células estromales de médula ósea (por sus siglas en inglés)
CS	Condroitín sulfato
DMEM	Medio mínimo esencial modificado por Dubelco
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N`-etilcarbodiimida
EDS	Microanálisis de dispersión de energía de rayos X
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAG	Glucosaminoglucano
Ge	Gelatina
GTA	Glutaraldehído
HA	Ácido hialurónico
IT	Ingeniería de tejidos
LDH	Lactato deshidrogenasa
MEC	Matriz extracelular
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MMP	Metaloproteasa de matriz
MSC	Células troncales de adulto
PBS	Solución salina de fosfatos
PGA	Ácido poli-glucólico
PGLA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PVA	Alcohol poli-vinílico
RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

Uno de los objetivos de Ingeniería de Tejidos (IT) es construir andamios con materiales que sean biocompatibles con el cuerpo para ayudar a la regeneración de tejidos u órganos afectados por diversas patologías. Los polímeros que conforman la matriz extracelular (MEC) como la colágena y el ácido hialurónico (HA) son buenos candidatos para ser utilizados en la IT. La colágena es una proteína que forma fibras flexibles fundamentales en la MEC y es producida extracelularmente por la polimerización de la tropocolágena. La hidrólisis de la colágena da como resultado la gelatina (Ge) que es más económica y no presenta antigenicidad en comparación con su precursor, pero conserva los motivos bioactivos RGD (arginina-glicina-aspartato) de la colágena que permite la adhesión celular. Por otro lado, el HA es un glucosaminoglucano (GAG) que organiza la MEC y se ha observado que tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de agua, promueve la migración y proliferación celular, sin embargo, cuando es empleado para la fabricación de andamios no induce una fuerte adhesión. Debido a estos factores se han construido andamios híbridos que son entrecruzados con diferentes sustancias. El entrecruzado es un paso fundamental en la fabricación de andamios, ya que se forman enlaces covalentes entre los diferentes polímeros proporcionándole estabilidad al andamio. El EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) es una sustancia que forma enlaces amida entre la Ge y el HA, es el más utilizado ya que no forma parte del producto final y genera un subproducto derivado de la urea que es de baja toxicidad. El objetivo de este trabajo fue realizar andamios de Ge-HA entrecruzados a diferentes concentraciones de EDC para evaluar la porosidad, composición química, capacidad de absorción y citotoxicidad. Los andamios se prepararon por liofilización de una solución de Ge y HA a una concentración de 4% y 1% respectivamente. Se entrecruzaron con EDC a 6, 30, 50 y 60 mM. En los resultados se puede observar que el tamaño de los poros disminuyó conforme aumentó la concentración de EDC, el mismo fenómeno sucedió con la prueba de absorción. En cuanto a la composición química realizada mediante EDS se observó la presencia de carbono (C), oxígeno (O), sodio (Na), cloro (Cl), azufre (S), nitrógeno (N) y calcio (Ca). Los andamios entrecruzados a una concentración de 60 mM presentaron una mayor toxicidad. Finalmente se confirmó la presencia de células en los diferentes experimentos. En conclusión los andamios entrecruzados con EDC a diferentes concentraciones se podrían utilizar para el cultivo tridimensional de células para la generación de piel o hueso, ya que las características de los andamios construidos en el presente estudio como la porosidad, composición química, absorción y citotoxicidad son adecuadas para el establecimiento celular. Por lo tanto, las modificaciones en la concentración de EDC se podrían aprovechar para la construcción de andamios con diferentes características y sembrar en ellos distintos estirpes celulares resultando en la generación de diferentes tejidos.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años se han mejorado las técnicas de cultivo de células y tejidos, resultando en tejidos y/o órganos construidos en laboratorios con células provenientes del propio paciente y andamios o matrices que les sirvan de soporte. Esto se ha logrado gracias a los nuevos enfoques y al empleo de biomateriales.

Ingeniería de Tejidos

La Ingeniería de Tejidos (IT) es un campo multidisciplinario de la investigación biomédica que emerge de la biología molecular y celular, las técnicas de cultivo de células o tejidos y las ciencias en materiales (Ibarra y Warren, 2000). Su propósito es crear, reparar y/o reemplazar tejidos u órganos usando combinaciones de células, biomateriales y/o moléculas biológicamente activas que mejoren la proliferación y diferenciación celular para fabricar órganos o tejidos que se asemejen lo mejor posible a los del cuerpo, llevando con esto a revolucionar las terapias actuales y mejorar la calidad de vida de millones de pacientes que sufren de enfermedades congénitas o adquiridas con tejidos u órganos dañados (Pallua y Suschek, 2011). Por lo tanto las células, andamios y factores de crecimiento son componentes clave en la IT (Chan *et al.*, 2008). Las estrategias de la IT consisten en: el aislamiento de células específicas a través de una biopsia del paciente, después las células son sembradas en andamios biomiméticos bajo condiciones controladas para que las células crezcan y proliferen con o sin presencia de factores de crecimiento y/o diferenciación. Finalmente el andamio sobre el cual las células se colocan se degradará una vez que sea implantado en el cuerpo o si es necesario perdurará para continuar realizando su función, esto depende del órgano o tejido en donde se requiera (Fig. 1) (Pallua y Suschek, 2011).

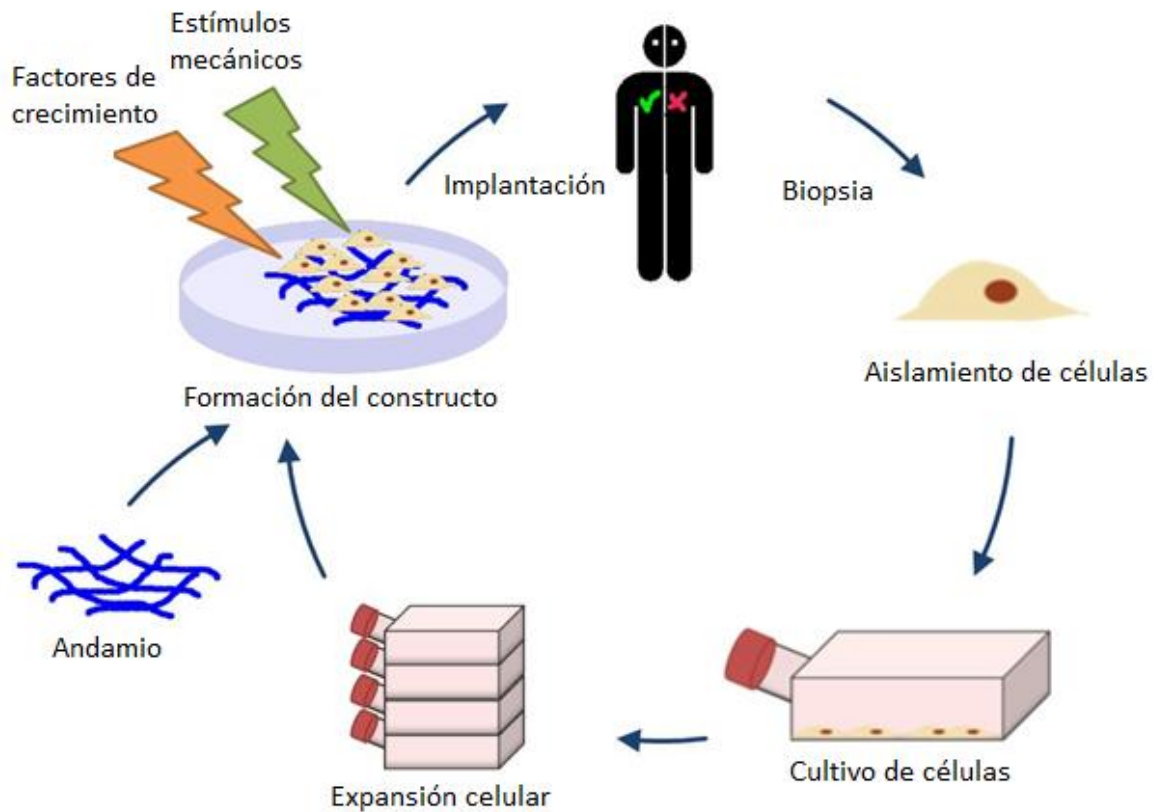


Figura 1. Paradigma central de la Ingeniería de Tejidos. Obtención de una biopsia del paciente. Aislamiento de las células. Cultivo de las células y su posterior expansión. Formación de un constructo con las células cultivadas y andamios prefabricados con estímulos mecánicos y factores de crecimiento. Tomado de: *Tissue engineering with the aid of inkjet printers*, 2012.

Células

La elección de una fuente celular es de vital importancia para iniciar un proyecto de IT ya que puede incluir células autólogas, alogénicas y xenogénicas. Cada una de estas categorías se pueden subdividir dependiendo el estado de diferenciación celular. Existen tres grupos de células sin alteraciones genéticas: las células indiferenciadas de origen embrionario o umbilical, las células diferenciadas que caracterizan a cada tejido del organismo (osteoblastos, fibroblastos, condrocitos, etc.) y las células sin diferenciar conocidas como MSC o células troncales del adulto, que pueden diferenciarse a diferentes estirpes celulares. Las MSC del adulto tienen ventajas y son más utilizadas que las embrionarias debido a cuestiones éticas, lo que facilita su accesibilidad y obtención ya que se encuentran en diversas zonas del organismo (Farriol y Esparza, 2008).

Las células para IT deben ser aisladas y expandidas en grandes cantidades. De hecho, estas células idealmente deben de ser de fácil expansión y deben ser capaces de soportar una gran cantidad de pases, tener un patrón de expresión de proteínas similar al tejido en donde se van a implantar y no presentar respuesta inmunológica (Salgado *et al.*, 2004).

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son citocinas secretadas por las células y funcionan como moléculas de señalización. La unión de los factores de crecimiento a su receptor inicia una señalización intracelular que puede llevar a diferentes eventos, como promover la adhesión, proliferación, migración y diferenciación debido a la regulación de varias proteínas, factores de crecimiento y receptores. Por lo anterior, dichas moléculas son esenciales para la formación de tejido y juegan un rol importante en la IT. Existen diferentes tipos de factores de crecimiento requeridos en los distintos tejidos, ejemplos de ellos son: las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), por mencionar algunos de los más usados. Las BMPs son una familia de proteínas que se expresan durante fases tempranas en la curación de fracturas. Su principal función es reclutar MSC en el sitio de la herida para inducir su diferenciación hacia osteoblastos. Las funciones biológicas del TGF- β son muy diversas. En presencia de este factor las células proliferan y promueven la producción de colágena *in vitro*. Sin embargo, debido a que se ve involucrado en varios eventos celulares, es crucial su control y su disponibilidad como un agente terapéutico. El VEGF es un potente factor angiogénico y es expresado en una gran variedad de tejidos altamente vascularizados, en heridas regula la vascularización a través del reclutamiento de células endoteliales que ayudarán a la curación gracias a la distribución de nutrientes y oxígeno a través del aporte sanguíneo. El FGF es otra citocina que promueve la proliferación y migración de fibroblastos y células endoteliales para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, además de que ha mostrado tener un efecto potencial en la cicatrización de heridas cutáneas (Lee *et al.*, 2011 y Salgado *et al.*, 2004).

Ciencia de Materiales

El tercer componente en la IT y centro de interés en nuestro estudio son los biomateriales. Sin embargo, para poder hablar de biomateriales, primero trataremos un poco a cerca de la Ciencia de Materiales. Esta ciencia estudia la relación entre la estructura y constituyentes de los materiales y sus propiedades así como la influencia de los procesos de elaboración. Divide a los materiales en: metales, cerámicos, polímeros y compuestos (González y Mancini, 2003).

Metales

Los materiales metálicos son sustancias inorgánicas que están formados por uno o más elementos con enlaces metálicos, son conductores térmicos y eléctricos, tienen alta resistencia mecánica, elevada rigidez, ductilidad y resistencia al impacto por lo que se utilizan ampliamente como materiales de soporte que se someten a grandes fuerzas mecánicas. Las primeras aleaciones metálicas desarrolladas como biomateriales fueron las de vanadio, empleadas para la fabricación de placas en fracturas óseas (placas de Sherman) y tornillos. Metales como el hierro (Fe), cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), titanio (Ti), tantalio (Ta), niobio (Nb), molibdeno (Mo) y el tungsteno (W) fueron usados como aleaciones y así fabricar implantes resistentes con baja respuesta inmunológica. Algunos elementos metálicos son componentes del cuerpo humano de forma natural pero en bajas concentraciones como el Fe en los eritrocitos o el Co que es necesario para la síntesis de la vitamina B-12. La biocompatibilidad de los implantes metálicos es preocupante debido a que sufren proceso de corrosión, para hacerlos inertes, se forma una capa de óxido en su superficie, proceso que se le conoce como pasivación (Parida *et al.*, 2012).

Cerámicas

Las cerámicas son materiales inorgánicos formados por compuestos químicos que contienen elementos metálicos y no metálicos. Debido a sus enlaces iónicos o covalentes, son generalmente duros, frágiles y resistentes a altas temperaturas; cristalinos, no

cristalinos o mezclas de ambos. Las principales biocerámicas son: alúmina, zirconia, hidroxiapatita, porcelanas, vidrios bioactivos, entre otros. Sus principales aplicaciones están en el sistema óseo, con todo tipo de implantes y recubrimientos en prótesis articulares; también se utilizan en aplicaciones dentales, en válvulas artificiales, cirugía de la espina dorsal y reparaciones craneales. Tienen baja reactividad química por lo que son generalmente inertes, se adhieren a los tejidos, tienen resistencia a la corrosión, compresión y desgaste; pero pueden sufrir fracturas ante esfuerzos de alto impacto y tiene baja resistencia a la tensión (Parida *et al.*, 2012).

Polímeros

Los materiales poliméricos constan de largas cadenas de compuestos orgánicos, no son cristalinos, tienen baja densidad, son malos conductores eléctricos y presentan baja temperatura de ablandamiento y descomposición. Los polímeros han sido ampliamente usados en suministros médicos desechables, prótesis, materiales dentales, implantes, apósitos, dispositivos extracorporales, encapsulantes, sistemas de administración de fármacos y productos de ingeniería tisular. La principal ventaja de los biomateriales poliméricos comparados con los metálicos y con los cerámicos es que son fáciles de fabricar y se producen de diferentes formas, tienen un costo razonable y pueden adoptar una gran variedad de propiedades físicas y mecánicas. Estos materiales tienden a denominarse biodegradables, ya que se pueden romper de forma natural en el cuerpo por medio de mecanismos hidrolíticos sin la ayuda de mecanismos enzimáticos (Parida *et al.*, 2012). Hoy en día, muchos tipos de polímeros de origen natural, como la colágena y su derivado (la gelatina), el quitosán y el ácido hialurónico (HA), o bien de origen sintético como el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y el ácido poli-glucólico (PGA) son usualmente utilizados para la fabricación de andamios (Liu *et al.*, 2012).

Compuestos

Finalmente un material compuesto se define como todo sistema o combinación de materiales construido a partir de una unión (no química, insoluble entre sí) de dos o más

componentes, que da lugar a uno nuevo con propiedades características específicas que no es posible obtener con los originales. Podemos identificar dos fases: una *continua* construida por la *matriz* y otra fase *discontinua* denominada *refuerzo*. Los componentes de un material compuesto no deben disolverse ni fusionarse completamente unos con otros. La identificación de los materiales y la de su interfase debe ser posible de distinguir por medios físicos. Las propiedades del nuevo material dependen del tipo de interfase y de las características de los componentes. Estos compuestos pueden seleccionarse para lograr combinaciones poco usuales de rigidez, rendimiento a altas temperaturas, dureza, conductividad, resistencia mecánica y resistencia a la corrosión (Besednjak, 2009).

En la Ciencia de Materiales existen tres ramas de estudio:

- La Ciencia Básica. Estudia la composición de los materiales, es decir, su estructura atómica y sus enlaces, propiedades físicas y químicas, difusión atómica, etc.,
- La Ingeniería de los Materiales que se dedica al diseño, fabricación y comportamiento de todo tipo de componentes y estructuras, utilizando diferentes materiales, ya que estos cambian su estructura dependiendo de los componentes, métodos y orden en el proceso de fabricación y
- Las Aplicaciones de los Materiales. Se enfoca a las aplicaciones que se les pueden dar a los materiales, por ejemplo en la construcción, en la industria básica y extractiva, metal-mecánica, agropecuaria, electrónica, eléctrica, médica, militares, etc. (González y Mancini, 2003).

Biomateriales

En las aplicaciones médicas o biológicas de los materiales se encuentran los biomateriales. Un biomaterial se define según Park y Lakes (2007) como cualquier material con el que se fabrican dispositivos para reemplazar una parte o función del organismo sin daños fisiológicos. Puede ser usado por cualquier periodo de tiempo sin que afecte al organismo y sin que resulte afectado por él, a menos que así sea diseñado (Piña, 2004). La ciencia de los biomateriales estudia las propiedades físicas, químicas y biológicas así como las aplicaciones de materiales tanto sintéticos como de origen natural destinados a

interactuar con sistemas biológicos. Un biomaterial es diseñado con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo (Clavijo *et al.*, 2010). La mayoría de las investigaciones en biomateriales han estado dirigidas hacia la síntesis, optimización, caracterización y el estudio de las interacciones del huésped con los mismos (Williams, 2009 y Chantarapanich *et al.*, 2012). En las últimas décadas los estudios y la fabricación de andamios para la IT con polímeros han incrementado debido a sus características y propiedades, en la presente tesis se realizaron experimentos con gelatina y ácido hialurónico de los cuales hablamos a continuación.

Gelatina

La **gelatina (Ge)** es un derivado de la colágena, la cual es una de las proteínas más comunes en el tejido conjuntivo, formando parte de la matriz extracelular (MEC) (Mariod y Adam, 2013), normalmente le da al tejido resistencia mecánica y rigidez (Grover *et al.*, 2012), representa alrededor del 25% de las proteínas del organismo, es una molécula no elástica y confiere resistencia a la tensión al tejido conjuntivo no calcificado. Se distinguen aproximadamente 29 tipos de colágena, sus diferencias se deben a cambios en la secuencia de aminoácidos (Gartner *et al.*, 2011). Cada molécula de colágena individual está formada por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas α y éstas cadenas se enroscan entre sí para formar una triple hélice dextrógira. Cada tercer aminoácido de la cadena es una molécula de glicina, excepto en los extremos de las cadenas α . Una hidroxiprolina o una hidroxilisina con frecuencia precede a cada glicina de la cadena; y una prolina a menudo sigue a cada glicina de la cadena. Las cadenas α que conforman la hélice de colágena no son iguales, su tamaño varía entre 600 y 3 000 aminoácidos (Ross *et al.*, 2012). La colágena se puede extraer de diferentes fuentes: los huesos de ganado, cueros, piel de cerdo y pescado son las principales. La Ge es una proteína que se obtiene por la desnaturalización parcial de la colágena, esto involucra la hidrólisis catalizada por enzimas, ácidos o bases. Existen dos tipos de Ge de mamífero: la de tipo A preparada por un proceso ácido, de origen porcino y el tipo B de origen bovino con un proceso alcalino. La desnaturalización se lleva a cabo en condiciones neutras o ligeramente ácidas a 40 °C, en

ese momento los enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos que ayudan a estabilizar la hélice de colágena se rompen y dan origen a unidades de tropocolágena. Finalmente se rompen los enlaces intramoleculares de las tres cadenas de las hélices α (Mariod y Adam, 2013). La gelatina es un polipéptido de alto peso molecular, es una proteína digerible que contiene todos los aminoácidos esenciales, excepto el triptófano. La composición de aminoácidos particularmente con respecto a la prolina y la hidroxiprolina puede variar de especie a especie. La Ge está compuesta por una secuencia de aminoácidos que son tripletes repetidos de glicina-X-Y, en donde X y Y son usualmente prolina e hidroxiprolina (Fig. 2), constitución de la colágena, es ampliamente utilizada para realizar andamios en IT porque se puede reabsorber en modelos *in vivo*, es fácil de extraer, soluble en agua, puede ser modulable debido a la existencia de grupos funcionales, no muestra antigenicidad y es más económica que la colágena (Hong *et al.*, 2004 y Grover *et al.*, 2012). Además tiene la región RGD de la colágena que corresponde a los aminoácidos arginina-glisina-aspartato, estos motivos son reconocidos por integrinas, que son glucoproteínas transmembranales que participan en la unión de las células a la MEC (Shachar *et al.*, 2011). La degradación de la Ge se debe a las metaloproteasa de matriz (MMP) que son enzimas que representan una familia estructural y funcionalmente relacionadas con zinc (Zn) y calcio (Ca) que degradan casi todas las proteínas de la MEC, por lo tanto son capaces de descomponer a la colágena y su derivado. Esta capacidad de degradación por enzimas propias del organismo son deseables para los andamios que se aplican *in vivo* porque permiten el remplazo por el nuevo tejido (Camci-Unal *et al.*, 2013). Sin embargo, cabe mencionar que la capacidad de degradación no siempre es necesaria. La Ge tipo A es degradada por la MMP-2 y la tipo B mediante la MMP-9, La familia de las metaloproteasas actúan extracelularmente a valores de pH neutro (Gorgieva y Kokol, 2011).

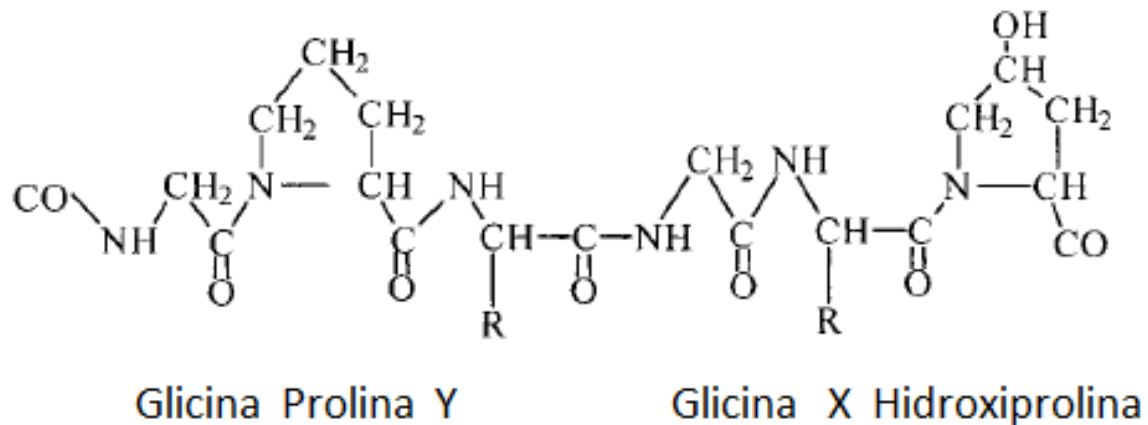


Figura 2. Estructura química de la gelatina. Tomada de Choi *et al.*, 1999.

Ácido hialurónico

Los glucosaminoglucanos (GAG's) son polisacáridos de cadena larga no ramificada con carga negativa formados por la repetición de unidades de disacáridos, el ácido urónico (ácido idurónico o ácido glucurónico) y un amino-azúcar (*N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina). La carga negativa que tienen los GAG's atrae iones Na^+ , que se unen a moléculas de agua procedentes del líquido extracelular, por lo que están muy hidratados. Su resistencia a la compresión y formación de geles se debe a que están asociados a núcleos protéicos. Existen diferentes tipos de glucosaminoglucanos que se muestran en el cuadro 1, todos los GAG's están sulfatados, a excepción del **ácido hialurónico (HA)** (Gartner *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Tipos de glucosaminoglucanos (GAG). Tomado de Gartner *et al.*, 2011.

GAG	Masa (Da)	Disacáridos repetidos	Localización en el organismo
Ácido hialurónico	10^7 - 10^8	Ácido D-glucurónico- β -1,3-N-acetil-D-glucosamina	La mayor parte del tejido conjuntivo, líquido sinovial, cartílago, dermis
Queratán Sulfato I y II	10,000-30,000	Galactosa- β -1,4-N-acetil-D-glucosamina-6-SO ₄	Córnea (queratán sulfato I), cartílago (queratán sulfato II)
Heparán Sulfato	15,000-20,000	Ácido D-glucurónico- β -1,3-N-acetilgalactosamina Ácido L-idurónico 2 o -SO ₄ - β -1,3-N-acetil-D-galactosamina	Vasos sanguíneos, pulmón, lámina basal
Heparina	15,000-20,000	Ácido L-idurónico- β -1,4-sulfo-D-glucosamina-6-SO ₄ Ácido D-glucurónico- β -1,4-N-acetilglucosamina-6-SO ₄	Gránulos de las células cebadas, hígado, pulmón, piel
Condroitín-4-sulfato	10,000-30,000	Ácido D-glucurónico- β -1,3-N-acetilgalactosamina-6-SO ₄	Cartílago, hueso, córnea, vasos sanguíneos
Condroitín-6-sulfato	10,000-30,000	Ácido D-glucurónico- β -1,3-N-acetilgalactosamina-6-SO ₄	Cartílago, gelatina de Wharton, vasos sanguíneos
Dermatán sulfato	10,000-30,000	Ácido L-idurónico- α -1,3-N-acetilglucosamina-4-SO ₄	Válvulas cardiacas, piel, vasos sanguíneos

El HA es un polisacárido natural, biocompatible y biodegradable compuesto por unidades de disacáridos repetidas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces alternados β (1-4) y β (1-3) como se muestra en la figura 3, es un GAG que forma parte de la sustancia fundamental de la MEC.

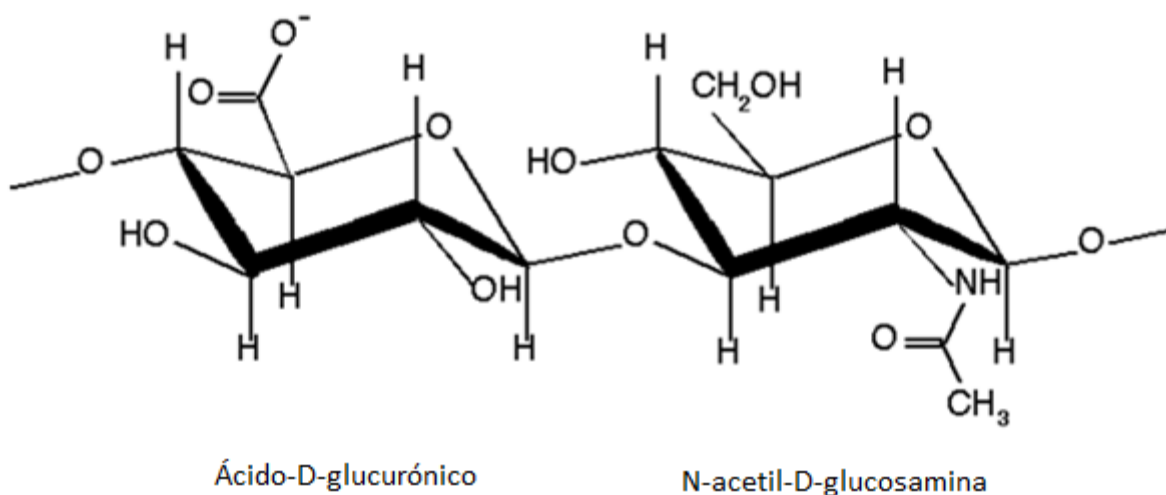


Figura 3. Estructura química del ácido hialurónico. Tomado de Onken y Admin, 2001.

El HA se presenta como glucosaminoglucano no sulfatado en la MEC de muchos fluidos y tejidos, así como los ojos, articulaciones y cartílago. Tiene una alta capacidad de lubricación, absorción y retención de agua e influye en varias funciones celulares como la adhesión, migración y proliferación (Choiet *et al.*, 1999). Se ha reportado que el HA puede promover el ensamblaje natural de la MEC mediante la interacción con otras proteínas que bajo condiciones fisiológicas estabilizan y organizan la MEC, regulan la adhesión y el crecimiento celular. El HA también ha demostrado tener un papel importante en promover la penetración de células en andamios debido a que tiene glucoproteínas de superficie celular como el CD44, que está implicado en las interacciones célula-célula, adhesión y migración celular (Spring *et al.*, 1988). Además el HA tiene una alta capacidad de retener agua en un medio biológico (Zhang *et al.*, 2011) y se ve implicado en procesos de cicatrización de heridas, angiogénesis e interacciones con receptores de membrana (Camci-Unal *et al.*, 2013). Sin embargo, el ácido glucurónico, disacárido que forma al HA, contiene grupos carboxilo cargados negativamente y le confiere al HA una propiedad polianiónica, esta propiedad no favorece termodinámicamente la adhesión celular y la subsecuente formación de tejido como se esperaría en la IT. Para mejorar la adhesión se cubren los andamios de HA con proteínas de MEC como la fibrina, fibronectina o colágena y en ciertos casos con sus derivados optimizando así las propiedades del andamio.

Características de los andamios

Los andamios son un soporte para las células y se pueden fabricar con diferentes tipos de biomateriales, deben proveer un ambiente similar a la MEC que permita a las células semejar su comportamiento *in vivo* de acuerdo a la aplicación como: tejido dérmico, cartílago, tejido óseo, entre otros. Por ello, se pueden enumerar las características necesarias para la fabricación de andamios adecuados para la IT:

1. Porosidad. Los andamios deben tener una estructura porosa completamente interconectada para proporcionar una amplia área de superficie y volumen que permitan el crecimiento celular, producción de MEC, formación de nuevo tejido, neovascularización, transporte de nutrientes y la remoción de desechos

metabólicos que son resultado de la actividad celular. Todo esto con el fin de facilitar la integración del andamio con el tejido u órgano receptor después de su implantación. El tamaño del poro es muy importante debido a que si los poros empleados son muy pequeños serán tapados por las células, impidiendo la migración de las mismas al interior del andamio y si son demasiado grandes el andamio tiende a perder sus propiedades mecánicas y las células pueden perderse (Chan *et al.*, 2008 y Salgado *et al.*, 2004).

2. Propiedades mecánicas. Los andamios deben tener la capacidad de resistir las fuerzas mecánicas, la presión hidrostática, ambientes fluidos, enzimas y especies reactivas de oxígeno a las cuales se encuentran sometidos los tejidos *in vivo* y de esta manera mantener el espacio que requieren las células en crecimiento y producción de MEC (Chan *et al.*, 2008 y Salgado *et al.*, 2004).
3. Biocompatibilidad. Los andamios deben permitir la adherencia y proliferación celular para crecer y diferenciarse ya sea en cultivo *in vitro* o *in vivo* sin causar una respuesta inmune o que ésta sea mínima. Además los biomateriales usados deben ser compatibles con los componentes celulares y los tejidos en donde serán implantados. Algunos biomateriales pueden incluir señales biológicas tales como ligandos para mejorar la adhesión debido a que algunas células dependen de estar ancladas para poder proliferar (Chan *et al.*, 2008, Grover *et al.*, 2012 y Salgado *et al.*, 2004).
4. Biodegradabilidad. Los andamios deben ser capaces de degradarse en productos no tóxicos a una velocidad equivalente a la nueva producción de matriz por el tejido en desarrollo. Además no deben causar inflamación o citotoxicidad al ser implantados en el cuerpo. Sin embargo, para ciertas aplicaciones es necesario que los biomateriales sean biodegradables, pero para otras se requiere que sólo sean biocompatibles y perduren en el organismo cumpliendo su función (Chan *et al.*, 2008 y Grover *et al.*, 2012).

Técnicas para la fabricación de andamios

Los andamios a base de estructuras poliméricas porosas pueden ser obtenidos a través de diferentes métodos. Cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio. En el presente trabajo se mencionan solo algunas de las técnicas más utilizadas para la fabricación de andamios en IT:

- Hilado en medio húmedo. Es una técnica en donde una fibra continua de polímero se produce por precipitación de un filamento de polímero en un medio compuesto por una solución en donde el polímero no puede disolverse. Así un filamento de la solución del polímero se solidifica debido a que es insoluble. Varios estudios han reportado el desarrollo de fibras de polímeros naturales fabricadas con esta técnica pero tienden a ser finas estructuras con poros muy grandes (Salgado *et al.*, 2013).
- El electrohilado (*electrospinning*) produce mallas de fibras que varían en diámetro, desde los 10 nm hasta las 10 μm . Se pueden usar materiales sintéticos o naturales, esta técnica se basa en la aplicación de fuerzas electrostáticas para conducir a la formación de fibras. En esta técnica una solución de polímero es inyectada por una aguja capilar de metal en donde se aplica un potencial eléctrico que vence la tensión superficial y forma un hilo eléctricamente cargado que se mueve hacia la placa colectora por interacciones electrostáticas y en el colector el disolvente se evapora y se solidifican las fibras. Es una buena técnica, sin embargo, los andamios tienden a ser delgados y se presentan poros grandes (Lannutti *et al.*, 2007).
- Impresión 3D en donde una impresora deposita una solución aglutinante sobre un biomaterial en polvo, después una nueva capa de polvo se extiende sobre el anterior y se repite el ciclo de impresión. Las capas de polímero se unen cuando se deposita la solución aglutinante y al final del proceso se retira el polvo sobrante que no se unió a las capas del andamio. Se ha utilizado el agua como solución aglutinante y de esta manera se elimina el problema de utilizar disolventes orgánicos. Por otro lado, la extracción del polvo sobrante de un modelo de forma

porosa es difícil y la resolución de la impresora depende del grosor de la boquilla y el movimiento de la cabeza de impresión (Carletti *et al.*, 2011).

- Finalmente la técnica de fabricación de andamios porosos mediante **liofilización** se ha convertido en un proceso de secado para la conversión de las soluciones de materiales lábiles en sólidos. Esta técnica implica tres pasos fundamentales: primero la solución se congela a una temperatura de -70 a -80 °C, una vez la muestra congelada se coloca en una cámara en donde baja la presión (a unos pocos milibares) y finalmente los cristales de hielo se eliminan mediante sublimación directa y la mayor parte de agua no congelada en el material se elimina por desorción (eliminación de materia desde un medio adsorbente). Una de las ventajas que tiene este método es que se utiliza hielo en lugar de disolventes orgánicos y así es más adecuado para aplicaciones biomédicas (Lu *et al.*, 2013). La sublimación de los cristales es lo que provoca la formación de una esponja que si se fabrica con polímeros altamente hidrofílicos nos dará como resultado un hidrogel (Camci-Unal *et al.*, 2013).

La liofilización es una de las técnicas más utilizada para crear andamios porosos compuestos por dos o más polímeros, en este caso la Ge y el HA. Una desventaja de dichos andamios es que son pobres en cuanto a sus propiedades mecánicas. Sin embargo, nuevos enfoques en el diseño han revitalizado este campo en la investigación en biomateriales, por ejemplo el uso de sustancias entrecruzantes (moléculas con al menos dos grupos funcionales reactivos que permiten la formación de enlaces entre polímeros) que ayudan a mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles (Berger *et al.*, 2004 y Kopecek, 2007).

Entrecruzantes

El entrecruzado es el proceso de unión química de dos o más moléculas mediante un enlace covalente, dicho proceso se realiza con diferentes agentes entrecruzantes, que son moléculas que tienen dos o más extremos reactivos capaces de unir químicamente grupos

funcionales (aminas primarias, carboxilos, sulfidrilos o grupos carbonilo) específicos de proteínas u otras moléculas (*Chemistry of crosslinking*, 2013). Como ya se mencionó este proceso es importante en la IT, debido a que nos proporciona un material con mayor estabilidad. En la actualidad existe una amplia gama de métodos y sustancias entrecruzantes, en seguida se mencionan algunos de los más utilizados:

- Los dialdehídos son entrecruzantes que permiten una reacción directa en un medio acuoso, con bajas o sin la adición de moléculas auxiliares tales como sales reductoras, las cuales provocan una desventaja en cuanto a la toxicidad (Berger *et al.*, 2004). El glutaraldehído (GTA) es un dialdehído que reacciona con las cadenas del polímero y forma una base de Schiff (grupo funcional que contiene un enlace doble carbono-nitrógeno, con el átomo de nitrógeno conectado a un grupo arilo o alquilo, pero sin hidrógeno) que conduce a la formación de una imina (grupo funcional con estructura general $RR'C=NR''$, donde R'' puede ser un H^+ o un grupo orgánico, siendo este último caso una base de Schiff). Las iminas son el producto de condensación de una amina primaria con una cetona o un aldehído. La formación de iminas con aldehídos terminales lleva a la formación de grupos carbonilo entre las cadenas del polímero (Li *et al.*, 2013). Sin embargo, se sabe que el GTA residual es la principal razón de la citotoxicidad del andamio. El método para quitar ese GTA residual es realizar lavados con agua destilada (Liu *et al.*, 2012) pero el GTA forma parte de las cadenas del polímero entrecruzado y tiene el potencial de lixiviarse (es cuando un disolvente líquido pasa a través de un sólido disolviendo uno o más de los componentes solubles del sólido) y tiene repercusiones tóxicas para las células (Haugh *et al.*, 2011).
- El uso de la genipina es una alternativa interesante, ya que se encuentra de forma natural en el cuerpo, se usa en la medicina herbaria y como un colorante en la comida, además tiene baja citotoxicidad en cultivos *in vitro* y ha mostrado biocompatibilidad después de ser inyectada en ratas (Berger *et al.*, 2004). El mecanismo de reacción del entrecruzado con genipina es que se forma un monómero de genipina-grupo amino a través de un ataque nucleofílico por los

grupos amina que contienen los polímeros como la gelatina y se ataca al tercer carbono de la genipina. Después se rompe la estructura de la genipina al abrir su anillo y forma un grupo aldehído. Posteriormente, el grupo aldehído resultante es atacado por el grupo amino secundario adjunto de la genipina. Por lo tanto la genipina con una estructura heterocíclica puede formar productos entrecruzados intra e intermolecularmente (Chang *et al.*, 2003).

- El **N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)** que es una 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 en comparación con el EDC insoluble. En este entrecruzamiento se sugiere la formación de enlaces éster entre los grupos hidroxilo y carboxilo para finalmente formar enlaces amida. El EDC puede reaccionar con los grupos carboxilos de la gelatina y el HA para formar una O-urea activa. Este intermediario puede reaccionar con cualquiera de los grupos aminos disponibles en la gelatina para formar el enlace amida o liberar un producto de urea soluble, el EDC puede ser fácilmente desactivado con agua destilada (Choi *et al.*, 1999).

Debido a que la carbodiimida es soluble en agua se usa preferentemente como agente entrecruzante ya que no se incorpora en la estructura entrecruzada, simplemente cambia a un derivado de urea soluble en agua que tiene muy baja citotoxicidad (Choi *et al.*, 1999). Por lo anterior, el agente entrecruzante empleado en la presente tesis fue el EDC.

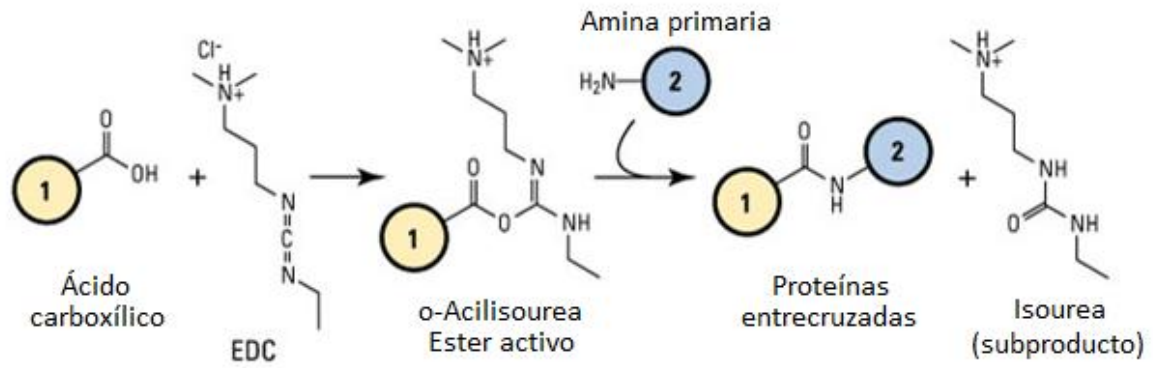


Figura 4. Esquema de la reacción que provoca el EDC al entrecruzar dos sustancias. Las moléculas (1) y (2) pueden ser péptidos, proteínas o sustancias químicas que tengan grupos carboxilos y aminas primarias. Tomado de Chemistry of crosslinking, 2013.

ANTECEDENTES

La Ge y el HA son frecuentemente usados en la IT debido a sus características, sin embargo, es necesario incrementar las prestaciones funcionales cuando son utilizados para fabricar andamios, esto se puede lograr mediante el entrecruzado de los polímeros.

En la actualidad se han construido andamios de Ge-HA entrecruzados con EDC, sin embargo, este entrecruzante se ha utilizado a diferentes concentraciones. Por ejemplo Choi *et al.*, (1999) fabricaron andamios de Ge-HA entrecruzados con EDC a una concentración máxima de 6 mM, sus resultados indican que aquellos andamios no entrecruzados tuvieron menor resistencia a fuerzas mecánicas que los entrecruzados, y esta resistencia aumentaba de forma proporcional al incrementar la concentración de EDC. Realizaron también pruebas de degradación *in vitro* utilizando colagenasa bacteriana y observaron que los andamios con una mayor concentración de EDC tardan más tiempo en ser degradados. Por otro lado, los estudios realizados por Zhang *et al.*, en 2011, reportan que la concentración de 50 mM de EDC es la óptima para entrecruzar Ge y HA, sin embargo, en sus experimentos modificaron las proporciones de los polímeros. Los resultados obtenidos en este estudio fueron que a medida en que se aumenta la proporción de HA, los poros tienden a ser más grandes, irregulares y alargados en comparación con los andamios donde solo se empleó la Ge, la proporción que presentó las mejores características fue la relación 8:2 de Ge-HA. Al igual que en el estudio de Choi *et al.*, (1999), la capacidad de absorción de PBS del andamio incrementó proporcionalmente a la cantidad de HA ambos estudios, en la prueba de degradación, donde se sumergieron los andamios en PBS a 37 °C, se encontró que los andamios con mayor proporción de HA se degradaron más rápido, lo que nos indica que la adición de Ge ayuda a la estabilidad de dichos andamios. Además comprobaron mediante análisis de resistencia a fuerzas mecánicas el incremento de las mismas, conforme se agregaba Ge. En cultivos *in vitro* realizados con fibroblastos de ratón (L929) sobre el andamio de Ge-HA entrecruzados con 6 mM de EDC Choi *et al.*, (1999) a las 24 h, observaron las células dentro de los poros del andamio y además realizaron ensayos de citotoxicidad con MTT

donde encontraron que emplear la gelatina a mayor concentración no produce daño celular.

Hong *et al.*, en 2004 fabricaron andamios de Ge-HA mediante la técnica de liofilización y los entrecruzaron con EDC a 0.78 mM. Este grupo de trabajo realizó pruebas de degradación por implantación subcutánea en ratas, encontrando que, al día 15, el 60% aproximadamente del andamio se degradó. Diversos investigadores han usado a la Ge y al HA para la fabricación de hidrogeles, por ejemplo Lian *et al.* en 2013 fabricaron andamios mediante la técnica de electrohilado empleando 1.5 M de EDC, con diferentes proporciones de Ge y HA. En los resultados tanto en la prueba de absorción y de citotoxicidad son similares a las reportadas a Hong *et al.*, en 2004.

En estos estudios se utilizan los mismos polímeros para construir los andamios, es decir, se utiliza la Ge, HA y como entrecruzante el EDC, sin embargo, las concentraciones de EDC son diferentes. Debido a esto, el enfoque de la presente tesis es conocer las características que confieren las diferentes concentraciones de EDC a los andamios de Ge-HA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pérdida de la estructura o función de un tejido puede deberse a lesiones como quemaduras en el caso de la piel, fracturas o defectos óseos ó bien pueden ser enfermedades congénitas o adquiridas, por lo cual la fabricación de nuevos andamios con las mejores características físicas, químicas y biológicas son un elemento esencial para la IT. La Ge, siendo un derivado del colágena, es un producto no tóxico que es biocompatible con el cuerpo, que preserva las regiones RGD de la colágena que ayudan a la adhesión de las células para que éstas proliferen y nos ayuden en la cicatrización o reparación del tejido afectado, además de ser considerablemente más económico y más accesible. Sin embargo, se ha visto que el uso de la gelatina tiene limitaciones en cuanto a que es de fácil degradación y el tiempo que permanece en el organismo no es suficiente para la regeneración del tejido. Para solucionar esta deficiencia de la Ge, al andamio que se

preparó para este trabajo, se le adicionó HA, el cual es un glucosaminoglucano que está presente de forma natural en el cuerpo organizando a la MEC, ayudando a la retención de agua, cicatrización de heridas, proliferación celular y angiogénesis. Se ha observado que la aplicación de estos polímeros de manera individual o en mezclas no entrecruzadas covalentemente, tienen una vida media corta cuando son implantados en tejido conjuntivo. Con la finalidad de mejorar la estabilidad y permanencia en el cuerpo de estos andamios se realiza el proceso de entrecruzamiento. Actualmente el proceso de entrecruzado se realiza por diferentes métodos y reactivos, el EDC es uno de ellos que actúa en los grupos funcionales del HA y la Ge formando enlaces amida entre ellos y como subproducto de esta reacción nos da una urea soluble que puede ser retirada del andamio con lavados de agua destilada. Las características físicas de los andamios entrecruzados con EDC varían dependiendo de la concentración, por lo cual es necesario caracterizar dichos andamios de Ge-HA entrecruzados a diferentes concentraciones de EDC para poder aprovechar y extender al máximo su uso en los diferentes tejidos del cuerpo humano.

HIPÓTESIS

Si la estabilidad y estructura de los andamios de Ge-HA es dependiente de la concentración de EDC utilizado para su entrecruzamiento, entonces al construir andamios entrecruzados con distintas concentraciones de EDC se observará una relación entre la concentración de EDC y los cambios estructurales del andamio en términos de número y tamaño de poros, absorción de agua, composición química y citotoxicidad.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar los andamios de gelatina-ácido hialurónico entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC.

OBJETIVOS PARTICULARES

En andamios de Ge-HA entrecruzados con EDC a 6, 30, 50 y 60 mM:

- Cuantificar el número y el tamaño de los poros.
- Analizar la composición química.
- Evaluar la capacidad de absorción de PBS.
- Evaluar la citotoxicidad.
- Evidenciar la presencia de células cultivadas.

METODOLOGÍA

Diseño experimental



Fabricación de andamios de gelatina-ácido hialurónico (Ge-HA).

Se preparó una solución de Ge al 4% y HA al 1% en agua destilada (ambos de Sigma-Aldrich), se mantuvo en agitación constante con una barra magnética durante una hora a 50 °C. Se colocó aproximadamente 1ml de la mezcla de Ge-HA en tubos ependorf con capacidad de 1.5 ml. Posteriormente las muestras se congelaron al menos por 4 horas a -70 °C, después se congelaron con nitrógeno líquido y fueron liofilizadas por 12 h a una temperatura de -50 °C con una fuerza de vacío de 0.036mBar (tomado y modificado de Zhang *et al.*, 2011).

El entrecruzado se llevó a cabo después de liofilizar las muestras con EDC ((N-(3-dimetilaminopropil))-N'-etilcarbodiimida) (Sigma-Aldrich). La solución de EDC se preparó con diferentes concentraciones: 6, 30, 50 y 60 mM disuelto en etanol al 95% siguiendo el protocolo de Zhang *et al.*, 2011. Las muestras se sumergieron en dichas soluciones y se dejó reaccionar 24 h a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con agua desionizada y se liofilizaron de nuevo a las mismas condiciones. Se obtuvieron esponjas porosas que adoptaron la forma del tubo ependorf con un diámetro de 6mm (+/- 1mm) fueron seccionadas transversalmente a un espesor de 3mm obteniendo muestras circulares que fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta que se realizaran las pruebas.

Al primer corte que quedó expuesto al vacío y al segundo corte de cada uno de los andamios se les tomó fotografía con un sistema Multiphot Nikon.

Preparación de los andamios para microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDS).

Un fragmento de cada andamio Ge-HA entrecruzado con diferentes concentraciones de EDC se analizó sin recubrimiento de oro en MEB y se realizó un análisis de EDS (dispersión de energía de rayos X) para detectar los elementos presentes en las muestras y obtener sus espectros.

Preparación de los andamios para microscopia electrónica de barrido (MEB).

Una vez seccionados los andamios entrecruzados, se recubrieron con oro durante un minuto para ser observados con el microscopio electrónico de barrido; las imágenes digitales obtenidas se analizaron con el programa Image-Pro® Plus 7.0 para obtener el diámetro menor de los poros de cada muestra. Se midieron los poros de 4 fotos tomadas a una magnificación de 100X correspondientes a las diferentes concentraciones de EDC. Estas fotos fueron de zonas elegidas al azar, todos los datos obtenidos se introdujeron al programa estadístico (Graph Pad Prim 6) para hacer comparación múltiple entre los grupos experimentales.

Capacidad de absorción

Las esponja de Ge-HA sin entrecruzar y entrecruzada con EDC a 6, 30, 50 y 60 mM fueron pesadas en la balanza analítica, se registraron los pesos de cada uno de los andamios, se sumergieron en una solución de PBS durante 1 h y se volvieron a pesar. Este procedimiento se realizó por triplicado. Se obtuvo el porcentaje de la capacidad de absorción mediante la siguiente fórmula:

$$CA = [(P_H - P_S) / P_S] * 100$$

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).

Esterilización de los andamios

El protocolo para la esterilización fue tomado y modificado de Zhang *et al.*, 2011 en donde se sumergieron las esponjas en una solución de alcohol al 70% y se dejaron toda la noche bajo luz UV. Al día siguiente se lavaron las esponjas tres veces por 30 min con PBS estéril con antibiótico al 1%.

Obtención y purificación de las células estromales de médula ósea.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 270g que se mantuvieron bajo condiciones libres de pirógenos, con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum* con nutricubos “purina chow” y con ciclos de luz y 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 de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Para cada ensayo se sacrificó una rata, de las cuales se obtuvieron las tibias y fémures. Se les retiró la mayor cantidad de tejido muscular y se colocaron en solución de HBSS (solución salina balaceada de Hank's) frío, así se trasladaron a una campana de flujo laminar en donde se les dio un lavado con alcohol al 70% por un minuto para eliminar contaminación. Se retiró el alcohol y los huesos se pasaron a un tubo estéril de 50 ml, en seguida se le colocaron 10 ml de solución de HBSS, se lavaron los huesos y se decantó la solución. Dicho proceso se realizó tres veces. Finalmente a los huesos se les cortaron las epífisis de ambos extremos y con una jeringa de insulina se inyectó HBSS por un extremo del hueso cortado y las células se colectaron en una caja petri estéril. Las células en suspensión se colectaron en un tubo falcon de 15 ml y se centrifugaron por 10 min a 1200 rpm y a una temperatura de 4 °C. Se resuspendió el botón o pellet en medio de cultivo suplementado compuesto por DMEM (Medio mínimo esencial modificado por Dubelco)/ suero fetal bovino (SFB) 10% y antibióticos (Ab) 1% para finalmente sembrar las células en una caja de cultivo, se les adicionó medio hasta alcanzar los 10 ml y se colocaron en la incubadora a una temperatura de 37 °C y CO₂ al 5%. Transcurridos dos días se lavaron las células con HBSS para retirar los eritrocitos y células que no se adhirieron a la caja de cultivo. Nuevamente se les adicionaron 10 ml de medio de cultivo suplementado y se les cambio el medio cada tercer día hasta que llegaran a la confluencia para utilizarlas en los cultivos experimentales. Se consideró que las células adheridas son células estromales de médula ósea (BMSCs) como lo reporta Maniatopoulos *et al.*, en 1988.

Ensayos de citotoxicidad

Para realizar el experimento se colocaron muestras de los andamios entrecruzados a diferentes concentraciones de EDC (6, 30, 50 y 60 mM) ya estériles en una caja de cultivo de 96 pozos. A cada andamio se le sembraron 1×10^4 BMSC's (cultivadas por 14 días) en solución de HBSS y se dejaron incubar durante 4 h a 37 °C con 5% de CO₂. El experimento se realizó por triplicado para cada concentración de EDC. El control positivo de citotoxicidad fue colocar el sobrenadante de células expuestas a la luz UV en una solución de PBS, como control negativo se colocó PBS solo y sobrenadante de células no expuestas a UV ni a los andamios.

Después de las 4 h de incubación se tomaron 100 µl de sobrenadante de cada muestra y se colocaron en otra caja de 96 pozos, a cada muestra se les adicionaron 100 µl de la solución del kit de citotoxicidad (Citotoxicity Detection Kit LDH, Roche) y se dejó reaccionar durante 20 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Finalmente la caja de 96 pozos se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Cabe mencionar que se realizó tres veces el experimento y cada andamio por triplicado, de estos valores se realizó análisis estadístico.

Cultivo *in vitro*

Los andamios entrecruzados y esterilizados se colocaron en una caja de 96 pozos, se les inyectó a cada andamio una suspensión con 2.04×10^4 BMSC con una aguja de 0.3mm X 13 mm y se les adicionó DMEM suplementado. El medio se reemplazó diariamente hasta alcanzar 7 días en cultivo. El andamio con células se fijó con formol al 10% por 2 h y se incluyó en parafina para realizar cortes de un espesor de 5µm y teñirlas con H&E. Finalmente se tomaron fotografías con un microscopio Nikon Eclipse 80i.

Pruebas estadísticas

A los datos obtenidos se les aplicó una prueba de Kruskal-Wallis con el programa Graph Pad Prim 6, con un valor de $P < 0.5$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mezcla de Ge al 4% y HA al 1% entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC, dio lugar a andamios porosos semejantes a esponjas. La **Figura 1** muestra diferentes cortes de los andamios con las distintas concentraciones de EDC: 6 mM=**A**, 30 mM=**B**, 50 mM=**C** y 60 mM=**D**, la superficie en contacto directo con el vacío corresponde al **número 1** de la **figura 1** y el corte por debajo del anterior está representado por el **número 2** en la misma figura. Los poros pequeños se localizan en la parte superficial (**Fig. 1 A, B, C y D**) y en el corte siguiente se observaron poros irregulares que varían de tamaño conforme aumenta la concentración de EDC (**Fig. 2A, B, C y D**).

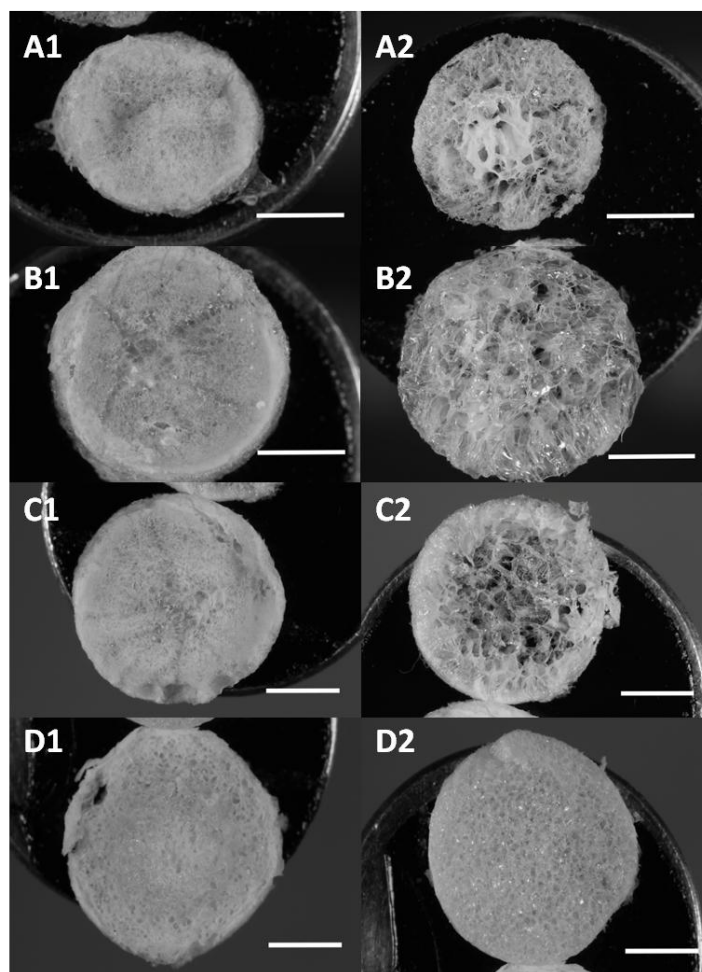


Figura 1. Fotografía de cortes transversales de los andamios de Ge-HA, tomada con un sistema Multiphot Nikon. **A**=6 mM, **B**=30 mM, **C**=50 mM y **D**=60 mM de EDC. Las imágenes **A1**, **B1**, **C1** y **D1**, corresponden a los cortes superficiales que quedaron expuestos a la fuerza de vacío de la liofilizadora (primer corte); las imágenes **A2**, **B2**, **C2** y **D2** fueron cortes inmediatos al primero (segundo corte). La barra representa 2.5 mm todas las imágenes.

En la concentración de 6 mM los poros son más grandes (**Fig. 1. A2**) en comparación a las demás concentraciones a excepción de la correspondiente a 50 mM (**Fig. 1. C2**) que tiene poros más grandes que la de 30 mM (**Fig. 1. B2**), a pesar de que todas las muestras fueron sometidas bajo las mismas condiciones durante el proceso de congelación y liofilización, el comportamiento de la concentración de 50 mM de EDC fue diferente. Para explicarlo nos basamos en los resultados reportados Zhang *et al.*, 2011 y Shabafrooz *et al.*, 2013 donde encontraron porosidades irregulares y exageradas en el centro de algunos de sus andamios de Ge-HA entrecruzadas con EDC después de ser liofilizadas, dando como explicación que este suceso corresponde a la formación de cristales más grandes sólo en esa sección o que la muestra no se congeló completamente antes de colocarla en la liofilizadora; originando así la formación de burbujas que dan lugar a la heterogeneidad en la superficie de la muestra una vez de completarse el proceso de liofilización. Debido a la coincidencia con sus resultados de MEB nosotros sugerimos que lo mismo ocurrió con el experimento de 50 mM de EDC en una de las 3 repeticiones que ocasionó que el promedio del poro bajara con respecto a la concentración de 30 mM, igualmente Gutiérrez *et al.*, 2007 indican que la congelación debe ser constante en todos los experimentos para que pueda ser reproducible y así no tener variaciones. Las muestras deben ser congeladas gradualmente, ya que si la temperatura baja demasiado rápido, se formarán cristales amorfos y por lo tanto los poros del andamio serán amorfos aunque ellos fabricaron sus andamios con alcohol poli-vinílico (PVA) y nosotros con Ge-HA.

La uniformidad de los poros en la parte superficial de la muestra (**Fig. 1 A, B, C y D**) se debe a que es la superficie primaria en contacto con el vacío que se produce en la cámara de secado de la liofilizadora y lo mismo pasa con las paredes del recipiente como también lo reportó Hong *et al.*, en 2004. Ellos realizaron sus experimentos con soluciones de Ge-HA liofilizadas para obtener andamios, en los cuales observaron poros uniformes y pequeños en la capa superficial, esto debido a la fuerza de vacío a la que se expone y corresponde también a la superficie de congelación, en comparación con el resto del área es decir la parte del centro de su andamio, lo cual concuerda con nuestro estudio.

Composición química

La caracterización en cuanto a la composición es de vital importancia para poder inferir el comportamiento que puedan llegar a presentar los andamios, por lo cual en este trabajo se realizó: análisis de dispersión de energía de rayos X (EDS) para conocer la composición química y microscopía electrónica de barrido (MEB), en donde se observaron los andamios de Ge-HA a diferentes concentraciones de EDC (6 mM, 30 mM, 50 mM y 60 mM), se midió el tamaño de poro y se analizaron los elementos presentes en cada muestra con el detector de rayos X acoplado al microscopio electrónico de barrido. La técnica se fundamenta en el bombardeo de electrones de alta energía que se impactan con los electrones que se encuentran en los orbitales interiores de los átomos que conforman la muestra y puede ser removido de su orbital así un electrón de un orbital exterior (con un nivel de energía mayor) ocupará el orbital incompleto. La energía liberada en este proceso es emitida en forma de un fotón de rayos X con una energía igual a la que había entre los dos orbitales. Ya que esta energía es característica de los elementos de los cuales se origina y de los orbitales entre los que ocurrió la transición del electrón, estos fotones son rayos X característicos de cada elemento (Roomans, 1982) y por ende podemos obtener información analítica cualitativa y cuantitativa de áreas del tamaño que deseemos de la superficie. Por ello se conoce esta técnica como microanálisis por EDS.

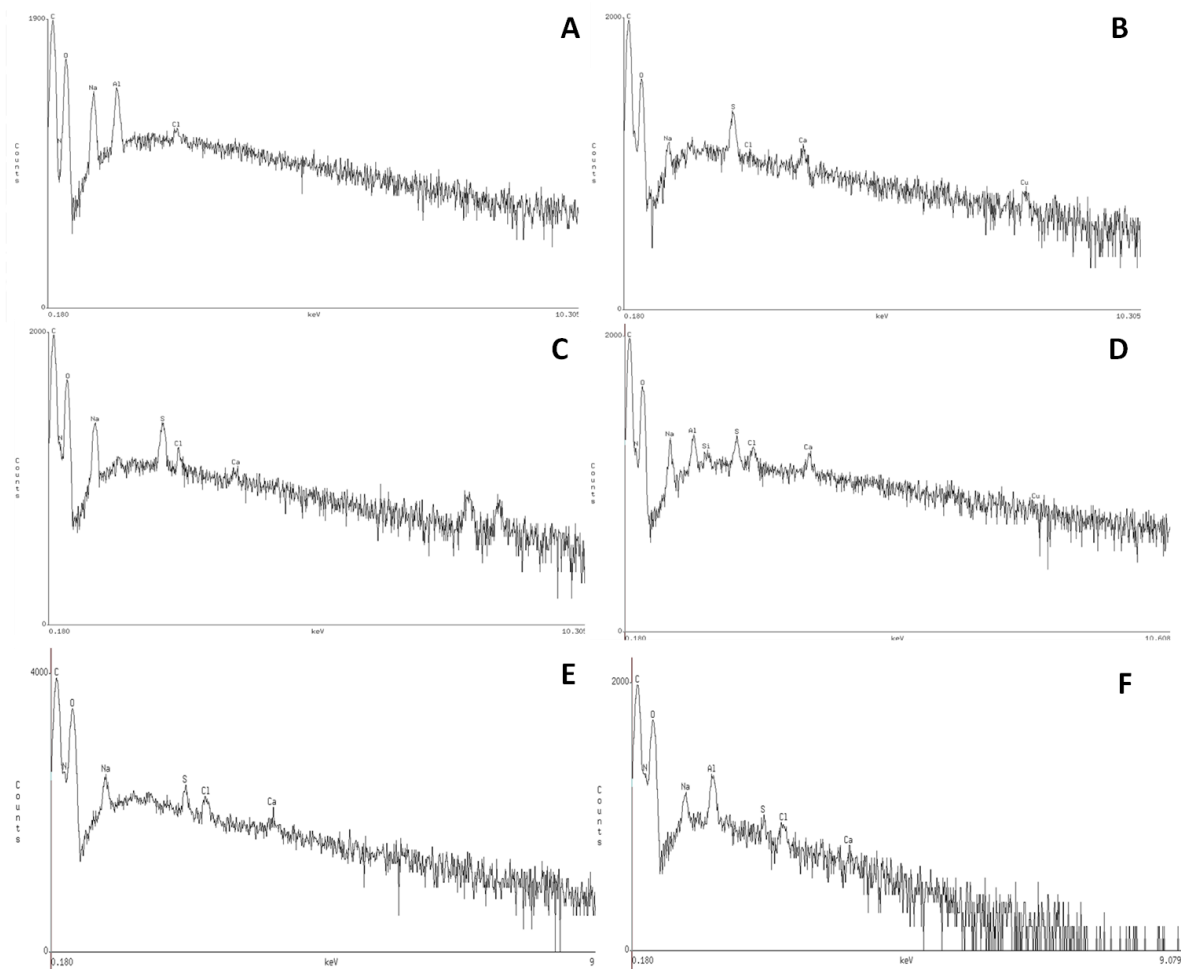


Figura 2. Se muestran los espectros obtenidos mediante EDS. **A.** Ácido hialurónico. **B.** Gelatina. **C.** Andamio Ge-HA entrecruzado con EDC a 6 mM. **D.** Andamio Ge-HA 30 mM. **E.** Andamio Ge-HA 50 mM. **F.** Andamio Ge-HA 60 mM.

La **figura 2** muestra los espectros de los elementos encontrados en cada experimento, después del proceso de liofilización en el HA (**Fig. 2A**), se observó la presencia de: C (carbono)= 49.69%, O (oxígeno)= 46.14%, Na (sodio)= 3.98% y Cl (cloro)= 0.20% en donde la cantidad de elementos presentes fue menor en comparación con la gelatina (**Fig. 2B**) en la cual se encontró: C= 57.68%, O= 34.77%, Na= 0.80%, Cl= 0.06%, S (azufre)=0.93%, N (nitrógeno)= 5.53% y Ca (calcio)= 0.17%. Todos estos elementos se encuentran formando los aminoácidos contenidos en la gelatina como lo reportaron Hong *et al.*, 2004 y Grover *et al.*, 2012, en donde se encuentran residuos de glicina, prolina, hidroxiprolina, ácido

glutámico, arginina, alanina, ácido aspártico y otros aminoácidos y coincide con los elementos identificados en este estudio.

Jui *et al*, 2012 fabricaron andamios de Ge y condroitín sulfato, les realizaron EDS por separado y a la mezcla. En sus resultados, el espectro de la Ge mostró la presencia de C, O, N y S, que coinciden con los reportados en esta tesis. Por otro lado, Toledo en 2006 fabricó andamios de HA, para caracterizarlos realizó EDS, en donde encontró la presencia C, H y O. En nuestros resultados además de obtener los mismos elementos se presentaron bajas proporciones de Na y Cl que pudieran estar presentes debido a pequeñas cantidades de sales del agua utilizada para la elaboración de los andamios.

En la mezcla de Ge-HA con 6 mM de EDC se detectaron los siguientes elementos C= 51.10%, O= 39.43%, Na= 2.28%, Cl= 0.22%, S= 0.80%, N= 6.10% y Ca= 0.10% (**Fig. 2C**); en la concentración de 30 mM C= 53.76%, O= 39.86%, Na= 1.15%, Cl= 0.30%, S= 0.43%, N= 3.78% y Ca= 0.24% (**Fig. 2D**). Los elementos presentes en los andamios de 50 mM de EDC fueron: C= 52.95%, O= 46.04%, Na= 0.72%, Cl= 0.12%, S= 0.13%, y Ca= 0.04% (**Fig. 2E**) y finalmente los elementos encontrados en la concentración de 60 mM fueron: C= 52.71%, O= 46.26%, Na= 0.80%, Cl= 0.15%, S= 0.06%, y Ca= 0.01% (**Fig. 2F**). Esto indica que todos los experimentos comparten los mismos elementos aunque varían ligeramente sus proporciones como se muestra en la **figura 3** donde se grafican los elementos presentes de todos los grupos experimentales, los cuales se presentan casi al mismo porcentaje en peso en todas las muestras, esto independiente de la concentración de EDC. Es de notar que el N no se detectó en las concentraciones de 50 mM y 60 mM (**Fig. 3**), en la literatura no se encontró referencia alguna en donde haya ocurrido el mismo fenómeno ya que el N es un componente de las cadenas de ambos polímeros pero no en altas proporciones y al no haber sido detectado por este método se sugieren dos explicaciones, la primera pudiera ser porque éstas muestras fueron analizadas meses después en el mismo aparato, es decir, las muestras de 50 y 60 mM (por triplicado) se almacenaron a temperatura ambiente por aproximadamente dos meses. Por lo que muy probablemente las muestras sufrieron modificaciones; la segunda explicación es que la técnica de EDS no es tan sensible para detectar este elemento si su proporción no es muy alta dentro del contenido

del andamio por lo que sugiere utilizar otras técnicas que evalúen formación de nuevos enlaces químicos como la espectroscopia de Infrarrojo o RAMAN.

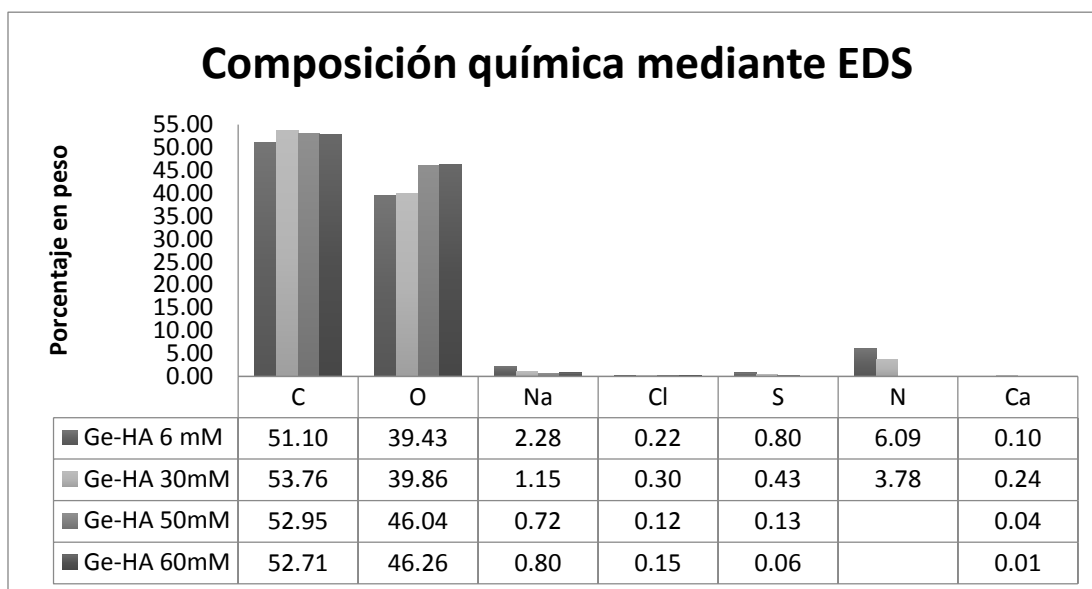


Figura 3. Gráfico en donde se agrupan los resultados del porcentaje en peso de cada elemento obtenido mediante EDS en los andamios de Ge-HA entrecruzados a diferentes concentraciones de EDC (6, 30, 50 y 60 mM).

Aún así podemos decir que los componentes químicos presentes en nuestros andamios de Ge-HA no se modifican por las variaciones en la concentración de EDC (a excepción del N, que se discutió anteriormente), por lo tanto nuestro material mantiene su composición química independientemente de la concentración de EDC que se utilice, lo que nos da como resultado un andamio que se puede entrecruzar a diferentes concentraciones del agente entrecruzante utilizado en este estudio para poder fabricar andamios con diferentes características como se muestra con el resto de las pruebas realizadas en la presente tesis.

Porosidad

La porosidad es un parámetro importante para los andamios debido a que facilita la migración celular, provee un microambiente apropiado para las células y permite la

transferencia de oxígeno, nutrientes y desechos dentro del constructo (Vasilescu *et al.*, 2011), por lo anterior se caracterizaron morfológicamente los andamios, ya que la porosidad puede ser modificada por el grado de entrecruzamiento mediado por la concentración del agente entrecruzante con el que se trabaje, como se realizó en el presente trabajo.

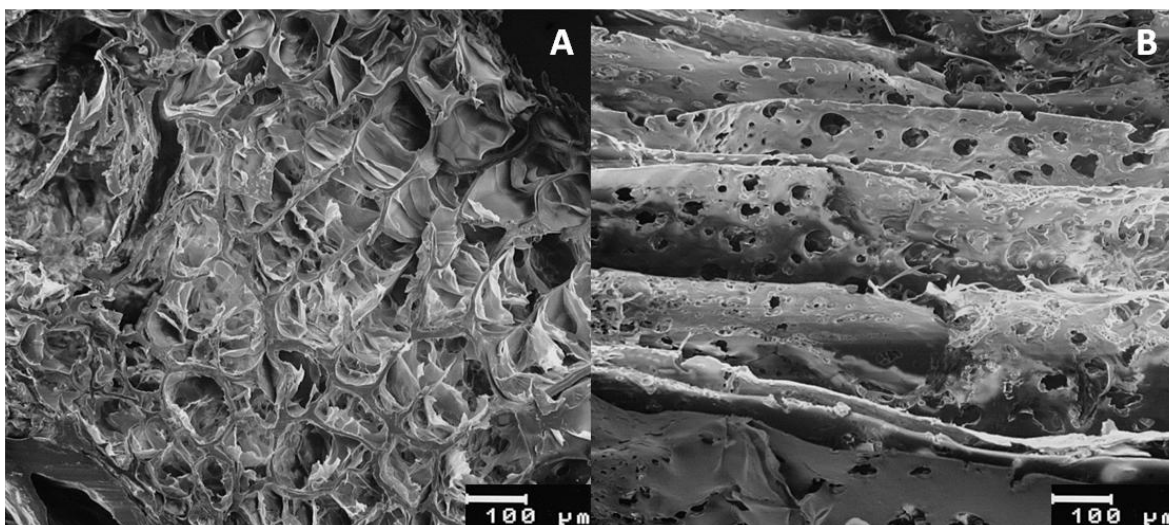


Figura 4. MEB (100X) de andamios liofilizados de Ge (A) y HA (B) puros.

En la **figura 4A** se observa la imagen obtenida mediante MEB de un andamio sólo de Ge, en ésta podemos observar poros irregulares y poco profundos, se muestra una disposición muy parecida a la que reportan Jui *et al.*, en 2012 al realizar un andamio de Ge para comparar andamios experimentales, en donde la estructura de los poros cambia su tamaño y distribución al adicionarle otro polímero. En contraste, el HA después del proceso de liofilización adquirió forma de lámina extendida que se puede apreciar en la **figura 4B**. La formación de láminas es una estructura característica de andamios de HA fabricados mediante la técnica de liofilizado, esto debido a que el HA nativo es rico en grupos hidroxilo, lo cual hace que sea más fácil reunir moléculas de agua e induce la formación de cristales de hielo más grandes durante la congelación (Zhang *et al.*, 2011), en contraste a lo que se observó en la gelatina pura. Ambas estructuras son la base de nuestros grupos experimentales ya que al mezclarlas y luego entrecruzarlas se obtendrán

andamios que nos permitirán mejorar las características de cada polímero individualmente como veremos más adelante.

En la **figura 5** se observa la combinación de Ge-HA entrecruzado con diferentes concentraciones de EDC 6 mM (**5A**), 30 mM (**5B**), 50 mM (**5C**) y 60 mM (**5D**), donde la forma de lámina del HA (**Fig. 4B**) dio lugar a poros más uniformes y más profundos con respecto a los formados en la Ge (**Fig. 4A**). El tamaño de los poros (**Fig. 5**) aumenta conforme se disminuye la concentración de EDC. Así los poros más pequeños se observaron en los andamios cuando se empleó la concentración de 60mM de EDC.

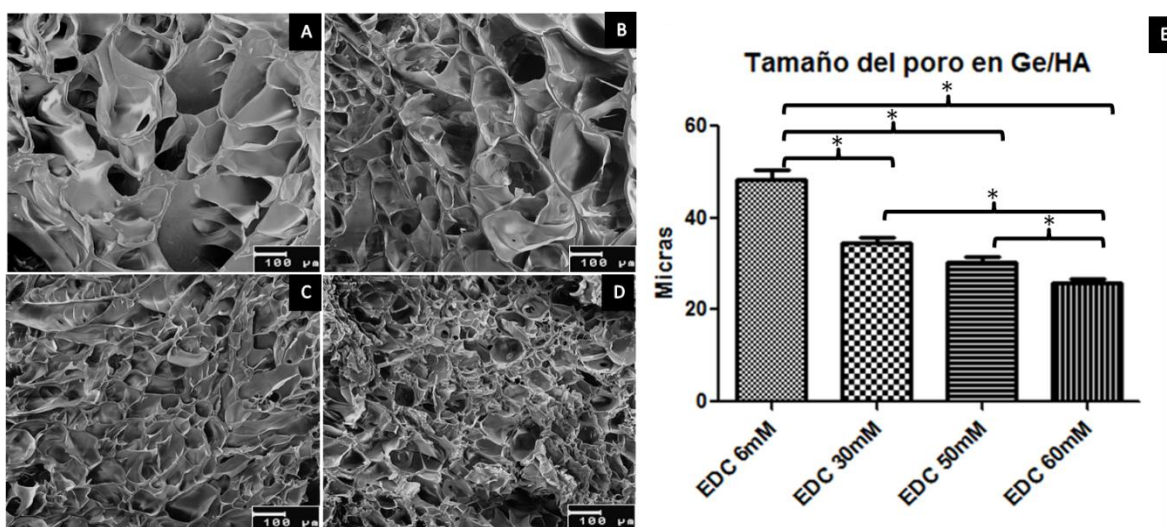


Figura 5. Se muestran imágenes de MEB (100X) de los andamios de Ge-HA entrecruzados a diferentes concentraciones de EDC (**A**=6 mM, **B**=30 mM, **C**=50 mM y **D**=60 mM) en donde se puede observar claramente una disminución del tamaño del poro conforme se aumenta la concentración de EDC. El gráfico **E**, nos muestra las medias del tamaño del poro, hubo diferencias significativas entre los andamios entrecruzados a una concentración de EDC de 6 y 60 mM representadas con los asteriscos ($p < 0.05$).

En la **figura 5E** se grafica la media del tamaño de poro de cada andamio, en donde podemos distinguir que el andamio de 6 mM tiene la media más grande con un tamaño de 48.2 μm , a la concentración de 30 mM le corresponde 34.69 μm , en 50 mM se reporta la media de tamaño de poro de 30.48 μm , las cuales van disminuyendo hasta llegar a 25.9 μm que pertenece a la concentración de 60 mM. Como se puede observar en la **figura 5 (A-D)** conforme disminuye el tamaño de los poros aumenta la cantidad, la concentración

de 6 mM presentó 162 poros/mm², en 30 mM se contaron 271 poros/mm², 322 poros/mm² se obtuvieron en la concentración de 50 mM y la mayor cantidad de poros contados fue de 416 poros/mm² en la muestra de 60 mM de EDC. La prueba de Kruskal-Wallis arrojó estos resultados en donde hubo diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$ entre todos los grupos a excepción de los grupos de andamios entrecruzados con 30 y 50 mM.

El tamaño de poro cambió entre las diferentes concentraciones de EDC por lo que la **figura 6E** representa variación del tamaño de los poros. La concentración de 6 mM presentó una mayor cantidad de poros con medidas máximas de 200 μm , sin embargo, al aumentar la concentración de EDC, la cantidad de poros con medidas de 200 μm fue menor, así en el andamio de 60 mM de EDC se aprecian sólo dos poros con medidas superiores a las 150 μm . En la **figura 6 A-D** se observan cortes de los andamios teñidos con H&E. Los poros más grandes y de tamaño irregular corresponden a las muestras de 6 mM (**Fig. 6A**) que indica un menor grado de entrecruzamiento, sin embargo se puede observar la disminución del tamaño del poro conforme se aumentó la concentración de EDC a 30 mM (**Fig. 6B**), 50 mM (**Fig. 6C**) y 60 mM (**Fig. 6D**) condición esta última donde se obtuvo un mayor grado de entrecruzamiento y aumentó la cantidad de poros debido a que son más pequeños.

Los andamios de Ge-HA entrecruzados con EDC realizados por Choi *et al.* (1999), obtuvieron tamaños de poro que van desde las 47 μm hasta las 153 μm , lo cual es similar a los resultados obtenidos en este estudio, donde las medias de tamaño de poro fueron de 26 a 48 μm dependiendo la concentración de EDC, encontrando poros de hasta 200 μm , por otro lado, Zhang *et al.*, en 2011, realizaron andamios de Ge-HA entrecruzados con EDC a 50 mM en donde modificaban las concentraciones de ambos polímeros y obtuvieron poros más grandes que los nuestros, en un rango que va desde las 189 μm a 415 μm , esto se debió a las proporciones de hasta el 80% de HA que utilizaron, ya que por sí solo el HA se presenta como láminas extendidas en forma de elipse de gran tamaño. Cabe señalar que en nuestro estudio no se varió la concentración de ácido hialurónico en

los experimentos, lo cual nos permitió obtener un tamaño de poro adecuado para su posterior aplicación.

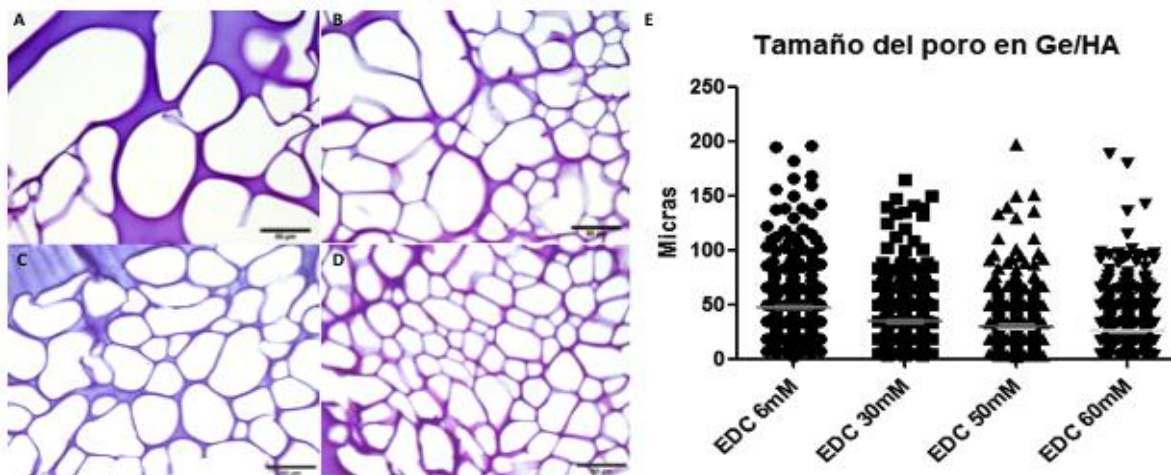


Figura 6. Se muestran imágenes (40X microscopio óptico, la barra representa 50 μm) de los andamios de Ge-HA entrecruzados a diferentes concentraciones de EDC (A=6 mM, B=30 mM, C=50 mM y D=60 mM) teñidos con hematoxilina. En el gráfico E podemos apreciar la distribución de los poros de acuerdo con su tamaño.

Aún no se tiene determinado cual es el tamaño de poro ideal para la aplicación en ingeniería de tejidos. Algunos autores (Zhang *et al.*, 2011 y Shabafrooz *et al.*, 2013) sugieren para tejidos duros un tamaño máximo de poro de 150 μm y para tejido blando de 200-250 μm , por otro lado Adekogbe y Ghanem (2005) consideran que el tamaño en general de los poros de los andamios debe estar en un rango que va de 15 a 150 μm . Es de notar que los resultados en este estudio, independientemente de la concentración de EDC, están en el rango establecido por los autores antes mencionados, ya que el mínimo tamaño de poro es de 26 μm y hasta un máximo de 200 μm . En conclusión los andamios construidos en este estudio pueden ser utilizados tanto para la aplicación en tejidos duros como suaves variando sólo las concentraciones de EDC.

Capacidad de Absorción

La retención de agua es favorable en la ingeniería de tejidos ya que previene la pérdida de fluidos corporales y nutrientes de los andamios durante el tratamiento (Shabafrooz *et al.*, 2013), por esta razón es de gran importancia conocer la capacidad de absorción de los andamios. En la presente tesis obtuvimos que la capacidad de absorción de PBS de los andamios Ge-HA con diferentes concentraciones de EDC es mayor en aquel andamio que no tiene entrecruzamiento. Dependiendo de la concentración de EDC, cada andamio adquirió un aspecto diferente, como se muestra en la **figura7**, en donde se observa que conforme aumenta la concentración de EDC disminuye la transparencia de los andamios, lo que se puede deber a la cantidad de agua que estén absorbiendo.

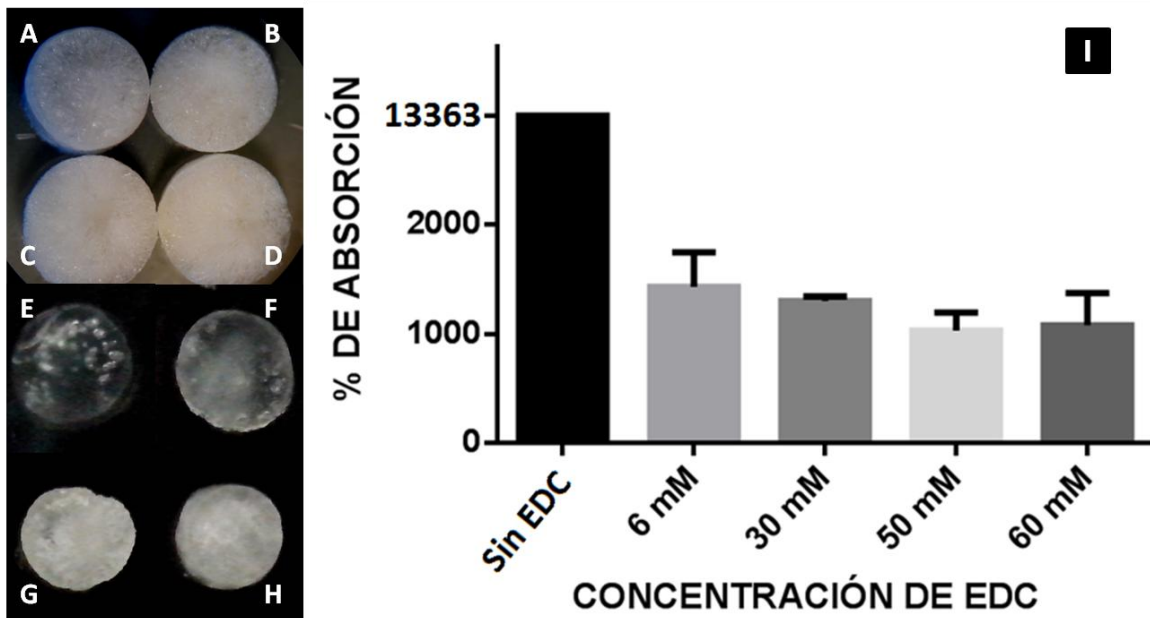


Figura 7. Andamios de Ge-HA entrecruzados a diferentes concentraciones de EDC (A=6 mM, B=30 mM, C=50 mM y D=60 mM) liofilizados. Debajo de éstas imágenes se encuentran andamios de la misma composición pero después de estar sumergidos en PBS (E=6 mM, F=30 mM, G=50 mM y H=60 mM). El gráfico I nos muestra el porcentaje de absorción de cada uno de los andamios después de estar inmersos en PBS por 1h.

La máxima absorción después de sumergir las muestras en PBS por una hora fue de 13,363% que corresponde al andamio Ge-HA sin entrecruzar que después de 3 horas se

desintegró; seguido por la muestra de 6mM con 1,432%, 30mM con 1,303%, 60mM con 1,081% y por último 50 mM con 1,033%. Se esperaba observar una disminución directamente proporcional con el aumento de la concentración de EDC, sin embargo, la muestra de 50 mM presentó ligeramente una menor absorción de PBS, en comparación con la de 60 mM.

Se ha reportado que al aumentar la concentración del entrecruzante, se disminuye la capacidad de absorción debido a que al entrecruzar dos sustancias se forman redes entre las cadenas de los polímeros, de ahí que si se coloca una menor cantidad del entrecruzante, se formarán menos redes y habrá una mayor cantidad de cadenas libres, que podrán separarse de las redes del polímero y con ello se pierde la estructura del gel hasta que se desintegra y se pierde la capacidad de absorción (Kabiri *et al*, 2003). Este fenómeno se puede observar en los trabajos de Zhang *et al.*, en 2011 que fabricaron andamios de Ge-HA entrecruzados con EDC a 50 mM. En sus resultados encontraron que al disminuir el tamaño del poro, la capacidad de absorción de agua disminuye, al igual que Shabafrooz *et al.*, en 2013 pero ellos fabricaron andamios de Ge-colágena-HA entrecruzados con genipina. Los resultados de ambos estudios son similares a los nuestros ya que al aumentar el tamaño del poro se tuvo mayor capacidad de absorber agua en contraste con los andamios con poros más pequeños que absorbieron menos agua, lo que pasa con las concentraciones de 50 y 60 mM de EDC.

Citotoxicidad

Después de obtener el sobrenadante de 4 horas del cultivo de los andamios con BMSCs se utilizó el kit para detectar la LDH. La enzima LDH es una oxidoreductasa que se encuentra en el citoplasma y convierte lactato a piruvato utilizando NAD como sustrato, éste es reducido a NADH. Finalmente el NADH se mide mediante una reacción acoplada en la que la sal de 2,4-dinitrofenilhidrazona se reduce hasta un producto de formazán rojo (Tengvall *et al.*, 2003). El incremento en la actividad de LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas, se lee en el espectrofotómetro a una longitud

de onda de 490nm. Los resultados de citotoxicidad obtenidos se muestran en la **figura 8**, donde se observa como la intensidad del color rojo disminuye conforme hay menos cantidad de células muertas en cada grupo experimental y en los controles (**Fig. 8a**). La **figura 8b** grafica la absorbancia de la reacción de LDH con el kit, donde la máxima absorbancia está en el control positivo de células muertas sin andamio con 0.68, la menor absorbancia de 0.2 en el grupo de células vivas no sembradas en el andamio Ge-HA y nada de absorbancia en un medio sin células. Vasilescu *et al.*, 2011, realizaron andamios de hidroxiapatita, B-fosfato tricálcico y una mezcla entre los dos, donde sembraron osteoblastos humanos y evaluaron la citotoxicidad mediante la prueba de LDH, obteniendo valores de absorbancia de aproximadamente 0.25 considerando con ello que sus materiales son biocompatibles y sus resultados son muy similares a los reportados en esta tesis donde la absorbancia de las células vivas es de 0.2, la de 50 mM es de 0.28 y la de 6mM es 0.32. En otros estudios donde se usa el HA y gelatina se reportan resultados semejantes, por ejemplo Dinescu *et al.*, 2013, fabricaron andamios de colágena, sericina de seda y les adicionaron condroitín sulfato (CS) o bien HA, los entrecruzaron con GTA y también realizaron la prueba para LDH. Los resultados que obtuvieron fueron al día 2 de cultivo donde la absorbancia tuvo valores por debajo de 0.2. Estos resultados nos indican la baja toxicidad de la colágena y del HA después de un proceso de entrecruzamiento. En el estudio realizado por Park *et al.*, 2002 donde utilizaron el contacto directo del andamios de colágena-HA en una relación 8:2 entrecruzados con 50 mM de EDC con una monocapa de fibroblastos de tejido conjuntivo de ratón (L929), reportaron que el andamio no mostró efecto en las células, es decir, no observaron lisis, granulación o cambios morfológicos en las células; lo cual fundamenta los resultados obtenidos en este trabajo.

El grupo experimental de 50 mM de EDC (**Fig. 8b**) tuvo diferencia significativa con el grupo de 60 mM y con el control de células muertas sin andamio, sin embargo no hubo diferencia significativa con el control de células vivas sin andamio, lo cual nos indica que el andamio no está induciendo la muerte de las células; con respecto a las concentraciones de 6 mM y 30 mM de EDC es importante destacar que tampoco tuvieron diferencia significativa con las células vivas sin andamio ni con la concentración de 50mM por lo que

también se pueden usar como concentraciones para entrecruzar los andamios de Ge-HA sin que ello cause un daño celular.

La concentración de 60 mM de EDC no tuvo diferencia significativa con el control positivo (células muertas) lo que indica que el andamio está induciendo muerte celular, la razón de esto puede deberse a que tiene una mayor concentración del entrecruzante y el proceso para retirar los residuos después del entrecruzado como lo menciona Park *et al.*, 2002 no fue suficiente y quizá se requiera de una cantidad mayor de tiempo que en las demás concentraciones para eliminar los residuos.

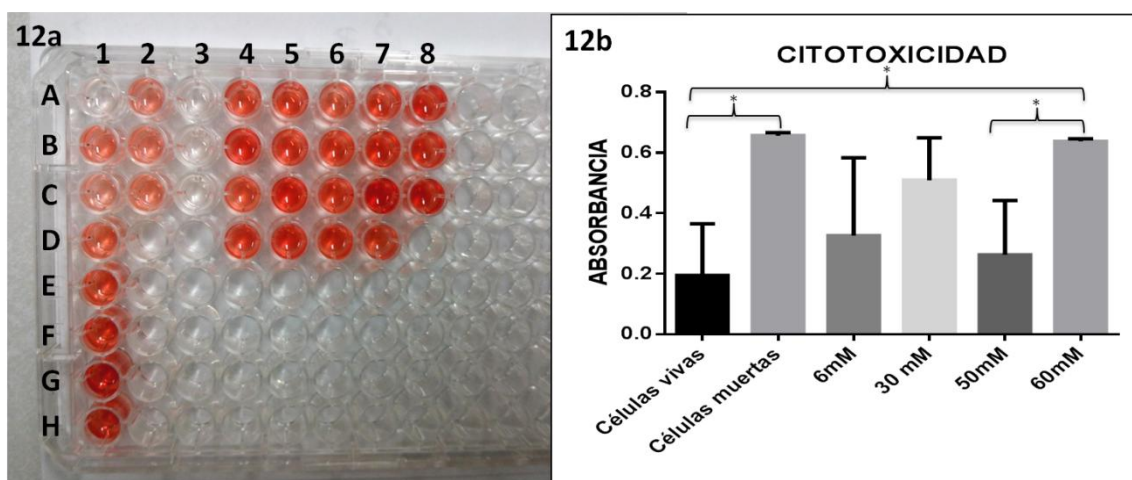


Figura 8. Prueba de citotoxicidad mediante la presencia de LDH (8a) en donde se observa la curva de muerte (pozos A1-H1), control de células sembradas sin andamio (pozos A2-C2), solución HBSS sin células (pozos A3-C3), células sembradas en los andamios entrecruzados a diferentes concentraciones de EDC 6 mM (pozos A4-D4), 30 mM (pozos A5-D5), 50 mM (pozos A6-D6), 60 mM (pozos A7-D7) y control de células muertas sin andamio (pozos A8-C8). Gráfico 8b representa la absorbanancia obtenida de los ensayos de citotoxicidad por triplicado en donde hay diferencias significativas con un valor de $*p < 0.05$ entre las células vivas y las muertas, entre las células sembradas en los andamios de 50 y 60mM y entre las células vivas y las sembradas en el andamio de 60mM.

Cultivo *in vitro*

Cuando se realizaron cortes en parafina teñidos con H&E de andamios sembrados con BMSC a 7 días de cultivo, se observaron células de forma alargada u ovalada dentro de los andamios, algunas de ellas adheridas a las fibras de Ge-HA (Fig.9). En los andamios entrecruzados a concentraciones de EDC de 6 mM, 30 mM y 50 mM se observaron células con citoplasma eosinófilo y núcleo redondeado con cromatina finamente granular (Fig. 9

A, B y C). Sin embargo, en los andamios entrecruzados con EDC a 60 mM se observaron células con núcleos pequeños y picnóticos y con las membranas notoriamente dañadas (**Fig. 9D**). Este hallazgo está claramente en concordancia con los hallazgos de citotoxicidad en las que se demostró que los andamios entrecruzados a concentraciones de 60 mM de EDC muestran un incremento en la citotoxicidad, en tanto que concentraciones menores de EDC como entrecruzado no indujeron citotoxicidad.

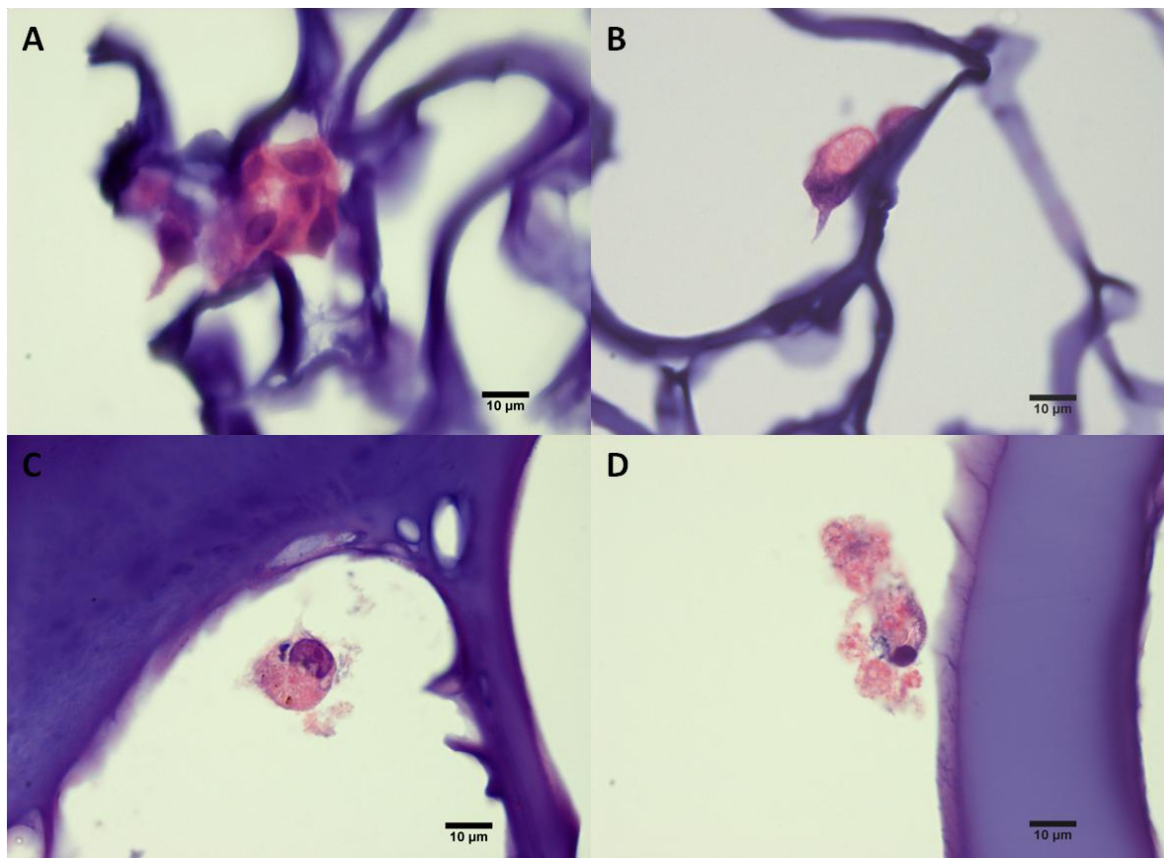


Figura 9. Fotografías de cultivos de BMSC's a 7 días. Andamios de Ge-HA entrecruzados con EDC a una concentración de: **A= 6 mM, B= 30 mM, C= 50 mM y D= 60 mM (100X).**

Los resultados reportados por Zhang *et al.* (2011) coinciden con los experimentos de 50mM en donde observaron a través de MEB la morfología celular y su ubicación dentro del andamio. Liu *et al* (2004) muestra también experimentos de cultivo celular de fibroblastos por 7 días y queratinocitos por 14 días, encontrando una buena integración de las células al andamio de quitosán-gelatina-ácido hialurónico entrecruzados con 50 mM de EDC, sin embargo, ellos sembraron una población celular cien veces mayor a la

empleada en este trabajo. Con base en nuestros resultados y en los trabajos anteriores (Zhang *et al.*, 2011 y Liu *et al.*, 2004) podemos sugerir que los andamios de Ge-HA entrecruzados hasta concentraciones de 50 mM de EDC permiten el cultivo *in vitro* con células que muestran buenas características morfológicas, por lo tanto podemos modificar las concentraciones de EDC por debajo de 50 mM para obtener andamios con diferentes grados de porosidad, capacidad de absorción y citotoxicidad que no afecten los cultivos celulares.

CONCLUSIONES

La caracterización de los andamios que se fabrican en IT es de suma importancia ya que si se conocen las propiedades físicas y biológicas del andamio se puede dar una mejor aplicación de acuerdo al sitio donde se implantará.

Con base en los resultados concluimos que el proceso de congelación es fundamental en la fabricación de los andamios Ge-HA ya que puede estar modificando el tamaño de poro, debido a la formación de cristales de agua durante la fase de congelación, dinámica independiente de la concentración y del agente entrecruzante, la morfología superficial de los andamios se ve modificada por la exposición a la fuerza de vacío que ejerce la liofilizadora, estas modificaciones se presentan en las paredes y en la superficie de contacto con el vacío donde los poros son muy pequeños pero es solo una delgada capa que no afecta la porosidad en el interior del andamio. A través de la técnica de EDS se identificaron los elementos que conforman nuestros andamios los cuales son constantes a excepción del nitrógeno. A través de las imágenes de microscopía electrónica de barrido observamos y concluimos que si se incrementa la concentración del agente entrecruzante, en este caso EDC, el tamaño de poro disminuye. De la misma manera sucede con la capacidad de absorción, es decir, si aumentamos la concentración de EDC, la capacidad de absorción disminuye en comparación con aquellos andamios que no se entrecruzaron y se desintegraron después de 3 horas de estar suspendido en PBS perdiendo todas sus características físicas. Con la prueba de citotoxicidad se concluye que las concentraciones

hasta de 50 mM de EDC no presentan citotoxicidad y es una buena opción para fabricar andamios de Ge-HA para IT. Finalmente con los cultivos *in vitro* se pudo evidenciar la presencia de células, en donde se observó que en los andamios entrecruzados con las concentraciones más bajas de EDC presentaron células con mejor morfología a diferencia de los andamios entrecruzados con EDC a 60 mM.

Con base en los resultados podemos concluir que las variaciones en la concentración de EDC al entrecruzar andamios de Ge-HA resultan en diferentes características que se pueden aprovechar para sembrar distintos estirpes celulares y ser aplicados a los pacientes que sufran de alguna condición clínica ya sea para órganos como la piel en úlceras cutáneas de origen diverso quemaduras o bien defectos en el tejido óseo que necesiten ser reparados, ya que con las diferentes concentraciones de EDC podemos obtener un andamio resistente para el tejido óseo o uno más suave para el tejido epitelial.

ANEXO

PBS (Buffer de solución salina de fosfatos)

Fosfato de Sodio monobásico	1.48g
Fosfato de Potasio dibásico	0.43g
Cloruro de Sodio	0.7g
Agua destilada	1L
Se ajusta el pH a 7.4	

HBSS (Solución Salina Balanceada de Hank's)

Cloruro de Potasio	0.4g
Fosfato de Potasio monobásico	0.06g
Cloruro de Sodio	8g
Bicarbonato de Sodio	0.35g
Fosfato de Sodio dibásico	0.048g
Glucosa	1g
Agua destilada	1L

Medio para crecimiento (Suplementado)

Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)	89ml
Suero Fetal Bovino (SFB)	10ml
Antibióticos (estreptomicina, penicilina y anfotericina β)	1ml

Solución de Tripsina

Tripsina	0.25%
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	0.02%
PBS	100ml

REFERENCIAS

- ❖ Adekogbe I., Ghanem A. (2005) Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 26: 7241-7250.
- ❖ Berger J., Reist J., Mayer J. M., Felt O., Peppas N. A., Gurny, R. (2004) Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 57: 19-34.
- ❖ Besednjak A. (2009) *Materiales compuestos*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, España. 15p.
- ❖ Carletti E., Motta A., Migliaresi C. (2011) Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods in Molecular Biology*. 695: 17-39
- ❖ Chan B. P., Lenng K. W. (2008) Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 17: S467-S479.
- ❖ Chantarapanich N., Puttawibul P., Sucharitpwatskul S., Jeamwatthanachai P., Inglam S., Sitthiseripratip K. (2012). Scaffold library for tissue engineering: a geometric evaluation. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2012: 1-14.
- ❖ Clavijo D., Orjuela J., Cardozo C., Torrado A., Covarrubias A. (2010) Hacia una nueva generación de materiales. Primera parte. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*. 24: 168-177.
- ❖ Camci-Unal G., Cuttica D., Annabi N., Demarchi D., Khademhosseini A. (2013) Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hidrogels. *Biomacomolecules*. 14: 1085-1092.
- ❖ Chang W. H., Chang Y., Lai P. H., Sung H. W. (2003) A genipin-crosslinked gelatin membrane as wound-dressing material: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 14: 481-495.

- ❖ Choi Y. S., Hong S. R., Lee Y. M., Song K. W., Park M. H., Nam Y. S. (1999) Studies on Gelatin-Containing Artificial Skin: II. Preparation and Characterization of Cross-Linked Gelatin-Hyaluronate Sponge. *J Biomedical Mater Research (Appl Biomater)*. 48: 631–639.
- ❖ Deng Y., Liu D., Du G., Li X., Chen J. (2007) Preparation and characterization of hyaluronan/ chitosan scaffold cross-linked by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. *Polymer International*. 56: 738-745.
- ❖ De Toledo M. J. (2006) *Hyaluronic acid-olfactory ensheathing cell compositions for spinal cord injury nerve regeneration*. Tesis de Maestría. Universidad de Florida.
- ❖ Dinescu S., Galateanu B., Albu M., Lungu A., Radu E., Hermenean A., Costache M. (2013) Biocompatibility assessment of novel collagen-sericin scaffolds improved with hyaluronic acid and chondroitin sulfate for cartilage regeneration. *Biomedical Research International*. Publicado en línea. Disponible en fecha en que lo revisaste: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/598056>
- ❖ Farriol F., Esparza R. (2008) Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatología. *Trauma Fundación MAPFRE*. 19: 88-101.
- ❖ Gartner L. P., Hiatt J. L. (2011) *Histología básica*. Elsevier. España. 342p.
- ❖ Gorgieva S. Kokol V. (2011) *Collagen vs. Gelatin Based Biomaterials and their Biocompatibility: Review and Perspectives*. En *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. Pignatello, R. (Ed.). InTech. 17-52p.
- ❖ Grover C., Cameron R., Best S. (2012) Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of mechanical behavior of biomedical materials*. 10: 62-74.
- ❖ González-Viñas W., Mancini H. (2003) *Ciencia de los materiales*. Editorial Ariel. Barcelona, España. 3-8p.
- ❖ Gutiérrez M. C., García-Carvajal Z. Y., Jobbágy M., Rubio F., Yuste L., Rojo F., Ferrer M. L., Del Monte F. (2007) Poly(vinyl alcohol) scaffolds with tailored morphologies

- for drug delivery and controlled release. *Advanced Functional Materials*. 17: 3505-3513.
- ❖ Haugh M. G., Murphy C. M., McKiernan R. C., Altenbuchner C., O'Brien F. J. (2011) Crosslinking and Mechanical Properties Significantly Influence Cell Attachment, Proliferation, and Migration Within Collagen Glycosaminoglycan Scaffolds. *Tissue Engineering: part A*. 00: 1-8.
 - ❖ Hong S. R., Chong M. S., Lee S. B. Lee Y. M., Song K. W., Park M. H., Hong S. H. (2004) Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid in rat subcutaneous tissue. *Journal of biomaterials Science, Polymer Edition*. 15:201-214.
 - ❖ Ibarra C., Koski J., Warren R. (2000) Tissue engineering meniscus: cell matrix. *Orthopedic clinics of North America*. 31 (3): 411-418.
 - ❖ Jui Y. L. (2010) Biocompatibility of chemically cross-linked gelatin hydrogels for ophthalmic use. *Journal of Mater Science*. 21: 1899-1911.
 - ❖ Kabiri K., Omidian H., Hashemi S., Zohuriaan M. (2003) Synthesis of fast-swelling superabsorbent hydrogels: effect of crosslinker type and concentration on porosity and absorption rate. *European Polymer Journal*. 39: 1341-1348.
 - ❖ Lannutti L., Reneker D., Ma T., Tomasko D., Farson D. (2007) Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Material science engineering C*. 27: 504-509.
 - ❖ Lee K., Silva E., Mooney D., (2011) Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and review of recent developments. *Journal of the Royal Society*. 8: 153-170.
 - ❖ Li Y., Liu T., Zheng J., Xu X., (2013) Glutaraldehyde-Crosslinked Chitosan/Hydroxyapatite Bone Repair Scaffold and Its Application as Drug Carrier for Icariin. *Journal of Applied Polymer Science*. 130: 1539-1547.
 - ❖ Lian Y., Yuan L., Ji L., Zhang K. (2013) Gelatin/hyaluronic acid nanofibrous scaffolds: biomimetics of extracellular matrix. *Acta Biochim Biophys Sin*. 45 (8): 700-703.
 - ❖ Liu T. V., Bhatia S. N. (2004) Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced drug delivery reviews*. 56: 1635-1647

- ❖ Liu H., Mao J., Yao K., Yang G., Cui L., Cao Y. (2004) A study on a chitosan–gelatin–hyaluronic acid scaffold as artificial skin *in vitro* and its tissue engineering applications. *Journal of Biomater Science Polymer*. 15: 25-40.
- ❖ Liu Y. Ma L. Gao C. (2012) Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. 32: 2361–2366.
- ❖ Lu T., Li Y., Chen T. (2013) Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 8: 337-350.
- ❖ Maniatopoulos C., Sodek J., Melcher A. H. (1988) Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and Tissue Research*. 254: 317-330.
- ❖ Mariod A. A., Adam H. F. (2013) Review: gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 12: 135-147.
- ❖ Onken M., Admin M. (2001) *What is hyaluronic acid?* Recuperado el 3 de Febrero de 2014 del sitio web de MadSci Network:
<http://www.madsci.org/posts/archives/2001-04/986571103.Bc.r.html>
- ❖ Pallua N., Suschek C. (2011) *Tissue engineering: from lab to clinic*. Springer. New York. 3p.
- ❖ Parida P., Behera A., Mishra S. C. (2012) Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Science*. 3: 31-35.
- ❖ Park J. Lakes R. S. (2007) *Biomaterials An introduction*. Springer. New York, USA. 2-8p.
- ❖ Park S., Park J., Kim H., Song M., Suh H. (2002) Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*. 23: 1205-1212.
- ❖ Piña B. C. (2004). *Biomateriales*. Apuntes de clase. Instituto de investigaciones en Materiales, UNAM. México. Apuntes no publicados.

- ❖ Ross M. H., Pawlina W. (2012) *Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 992p.
- ❖ Roomans G. M. (1982) *Atlas of human reproduction*. Springer. United States of America. 287p.
- ❖ Salgado A. J., Coutinho O. P., Reis L. R. (2004) Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience*. 4: 743-765.
- ❖ Salgado A. J., Oliviera J. M., Martins A., Teixeira F. G., Silva N. A., Neves N. M., Sousa N., Reis R. L. (2013) Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future. *International Journal of Neurobiology*. 108: 1-33
- ❖ Shachar M., Tsur-Gang O., Dvir T., Leor J., Choen S. (2011) The effect of immobilized rgd peptide in alginate scaffolds on cardiac tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 7: 152-162.
- ❖ Shabafrooz V., Mozafari M., Köhler G., Assefa S., Vashae D., Tayebi L. (2013) The effect of hyaluronic acid on biofunctionality of gelatin-collagen intestine tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research part A*. Consultado el 19 de diciembre de 2013. Publicado en línea <http://onlinelibrary.wiley.com.pbidi.unam.mx:8080/doi/10.1002/jbm.a.34984/pdf>
- Spring F. A., Dalchau R., Daniels G. L., Mallinson G., Judson P. A., Parsons S. F., Fabre J. W., Anstee D. J. (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.
- ❖ Tengvall P., Jansson E., Askendal A., Thomsen P., Gretzer C. (2003) Preparation of multilayer plasma protein films on silicon by EDC/NHS coupling chemistry. *Colloids and Surfaces*. 28: 261-272.
- ❖ Thermo Scientific. *Chemistry of crosslinking* (s. f.) Recuperado el 12 de Diciembre de 2013, de <http://www.piercenet.com/method/chemistry-crosslinking>
- ❖ *Tissue engineering with the aid of inkjet printers*. (2012) Recuperado el 2 de febrero de 2012 de <http://www.australianscience.com.au/biology/tissue-engineering-with-the-aid-of-inkjet-printers/>

- ❖ Vallet-Regí M. (2010) Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chimie*. 13: 174–185.
- ❖ Vasilescu C., Calderon J., Cimpean A., Coccaru D., Cinca I., Andronescu E., Grigore F., Galateanu B., Drob S. (2011) Synthesis, mechanical and structural properties and biological activity of some nanostructured bone scaffolds. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 6: 523-534.
- ❖ Zhang F., He C., Cao L., Feng W., Wang H., Mo X., Wang J. (2011) Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48: 474-481.
- ❖ Williams, D. F. (2009) On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 30:5897-5909.