



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ANDAMIOS FUNCIONALIZADOS CON AMINOÁCIDOS
COMO MEDIOS INDUCTORES DE LA REGENERACIÓN
ÓSEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ASTRID LUCERO SCHERLING OCAMPO

TUTORA: Dra. LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ

ASESOR: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la Facultad de Odontología.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyectos: IA202618 y IA203518.

A la Mtra. Sonia López Leytaf por su apoyo y orientación en las distintas fases de este trabajo.

Al auxiliar laboratorista Juan Manuel Trejo Ramírez por el cuidado y apoyo proporcionado durante el manejo a los animales de laboratorio.

A la Maestra en Ciencias Ana Lucía Tovar Álvarez, de la Universidad Autónoma de Querétaro y al Dr. Rodrigo Correa Prado por su invaluable aportación en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido.

DEDICATORIAS

A Lucero y Alfonso, por su amor incondicional, por ser mi apoyo y motivación; así como compartir mis sueños y ser el pilar fundamental para volverlos realidad.

A Aldo, Allan y Karen, por cuidarme, preocuparse por mí, por ser mis confidentes, cómplices, guías y ejemplos a seguir.

A Zoé y Alejandro Scherling por alegrar mi vida y aportarle más a la misma con una sonrisa, un abrazo o un beso.

A mi asesora y a mi tutor, la Dra. Lia A. Hoz Rodríguez y el Dr. Enrique Romo Arévalo por su entrega, dedicación, comprensión y paciencia para la realización de este trabajo.

A mis revisores y sinodales por el conocimiento y tiempo dedicado a la evaluación de mi trabajo.

A mis profesores de la UNAM y de la USC, por transmitirme su pasión por la odontología y alentarme en mis ambiciones.

A los integrantes de la clínica de Cirugía Oral y Maxilofacial de la UNAM por reafirmar conocimientos y valores fundamentales en el ejercicio profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi segundo hogar, por brindarme las herramientas y oportunidades para llegar hasta donde ahora estoy, ser quien soy y por permitirme conocer gente increíble en sus campus y fuera de ellos: Karla, Laura, Caro, Abril, Angie, Mika, Maggie y Vane.

A Edgar, por enseñarme que dedicar tiempo y transmitir tranquilidad son las mejores demostraciones de amor.

Afortunada y agradecida...

ÍNDICE

Índice de términos.....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Antecedentes.....	5
Planteamiento del Problema.....	17
Justificación.....	17
Objetivos.....	18
Hipótesis.....	18
Metodología.....	19
Fase 1. Elaboración de andamios.....	19
Fase 2. Pruebas <i>in vitro</i> y estudios de microscopia.....	22
Fase 3. Cirugía de defectos óseos en calvaria de rata.....	24
Fase 4. Procesamiento histológico y análisis de resultados.....	27
Resultados.....	30
Discusión.....	43
Conclusiones.....	45
Perspectivas.....	46
Referencias.....	47

ÍNDICE DE TÉRMINOS

μL	Microlitro
μm	Micrómetros
AA	Aminoácidos
<i>ad libitum</i>	a voluntad
ALP	Fosfatasa alcalina
Asp	Ácido aspártico
BSA	Albúmina de suero bovino
BSP	Sialoproteína ósea
Ca^{2+}	Calcio
CaCl_2	Cloruro de calcio
CEMP1-p3	Péptido de la proteína del cemento 1
DMP	Fosfoproteína de la matriz de dentina
EtOH	Etanol
FCT	Tejido conjuntivo fibroso
g	Gramos
Glu	Ácido glutámico
H_2O	Agua
H_3PO_4	Ácido fosfórico
HA	Hidroxiapatita
HACD1/CAP	Péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular
HEPES	Ácido (4-(2-Hidroxi)etil) piperazina-N-etanolsulfónico
hrCEMP1	Proteína del cemento 1 recombinante humana
IGF-I y II	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2
kDa	Kilodalton
M	Molar
MEC	Matriz extracelular
MEPE	Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular
mg/kg	Miligramo por kilogramo
mg/mL	Miligramo por mililitro
mJ/cm^2	Milijoule por centímetro cuadrado
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de calcio
OB	Osteoblastos
OCT	Osteocitos
OPN	Osteopontina
PAI	Activador de plasminógeno
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pH	Potencial de hidrógeno
PO_4^{3-}	Fosfato
RGD	Secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SIBLING	Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
UV	Ultravioleta

RESUMEN

El hueso es una forma especializada de tejido conjuntivo muy vascularizado e innervado, está estructurado en laminillas de matriz osteoide mineralizada; se compone fundamentalmente de células, una matriz orgánica y una matriz inorgánica, formada por pequeños cristales de hidroxiapatita (HA) $[Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$. En contraste, la matriz orgánica está compuesta principalmente de colágena tipo I con pequeñas cantidades de colágena no fibrilares de tipo III y V, además de agua, proteínas no colágenas y lípidos.

Estudios *in vitro* han demostrado que similar a las proteínas, los aminoácidos con carga son capaces de inhibir o inducir a la mineralización de la hidroxiapatita; aminoácidos como el ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu) y fosfoerina son muy abundantes en el dominio ácido de las proteínas no colágenas asociadas a la biomineralización (osteopontina, sialoproteína ósea, proteína de la matriz dentinaria).

Es por ello, que el objetivo de este trabajo fue evaluar si los aminoácidos incorporados a los andamios de alginato, colágena autógena y colágena xenogénica, favorecen el proceso de biomineralización en defectos óseos de tamaño crítico en calvaria de rata Wistar. Para dicho fin, se utilizaron 36 ratas macho de la cepa Wistar, en las que se realizó un defecto crítico óseo en la calvaria y se formaron grupos en los cuales se asignó un andamio (Alginato de sodio, Colágena autógena y Colágena xenogénica) funcionalizado con aminoácidos (Ácido glutámico, Fenilalanina o la mezcla de ambos según fuera el caso). La eutanasia se realizó a los 120 días posteriores a la implantación del andamio. Se procesaron las muestras para su análisis histomorfométrico utilizando la tinción Tricrómica de Masson e inmunofluorescencia para confirmar la presencia de BSP (Sialoproteína ósea) en las muestras. La histomorfometría de los andamios (de Alginato de sodio y Colágena xenogénica) con la mezcla de aminoácidos demostró la regeneración en promedio de 60% del defecto óseo. La inmunofluorescencia demostró la expresión de BSP en las zonas de neoformación ósea. Nuestros resultados demuestran que el andamio de Alginato de sodio y Colágena xenogénica funcionalizados con ambos aminoácidos ofrecen una alternativa terapéutica prometedora para la regeneración de tejido óseo.

ABSTRACT

Bone is a specialized form of highly vascularized and innervated connective tissue, which is structured in lamellae of mineralized osteoid matrix; It is formed by cells, an organic matrix and an inorganic matrix, which is formed by small crystals of hydroxyapatite (HA) $[Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$. And the organic matrix is mainly composed of collagen type I with small amounts of non-fibrillar type III and V collagen, water, non-collagen proteins and lipids.

In vitro studies have shown that similar to some specific proteins, charged amino acids are capable of inhibiting or inducing hydroxyapatite formation; Amino acids such as aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu) and phosphoserine are very abundant in the acid domain of non-collagen proteins associated with biomineralization (osteopontin, bone sialoprotein, dentin matrix protein).

That is why, the objective of this work was to evaluate whether the amino acids incorporated into scaffolds of alginate, autogenous collagen and xenogeneic collagen, favor the biomineralization process in critically-sized bone defects in Wistar rat calvaria. For this purpose, 36 male rats of the Wistar strain were used, in which a critical bone defect in the calvaria was made and groups were formed in which a scaffold (sodium alginate, autogenous collagen and xenogenic collagen) functionalized with amino acids (glutamic acid, phenylalanine or the mixture of both as the case may be). Euthanasia was performed 120 days after implantation of the scaffold. Samples were processed for histomorphometric analysis using Masson's Trichrome staining and immunofluorescence. The histomorphometry of the scaffolds (of sodium alginate and xenogeneic collagen) with the mixture of amino acids demonstrated the average regeneration of 60% of the bone defect. Immunofluorescence demonstrated the expression of Bone sialoprotein in areas of bone neoformation. Our results demonstrate that the xenogeneic sodium alginate and collagen scaffold functionalized with both amino acids offer a promising therapeutic alternative for bone tissue regeneration.

ANTECEDENTES

Tejido óseo

El hueso es una forma especializada de tejido conjuntivo muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide mineralizada; sus funciones principales, son: servir como reservorio de elementos inorgánicos que responden a la homeostasis del fluido extracelular, proporcionar protección de órganos y ser el soporte estructural que permite el movimiento, producir células sanguíneas y almacenar triglicéridos. Está compuesto por células especializadas, una matriz extracelular y una fase mineral; las células son hematopoyéticas y no hematopoyéticas en la médula ósea, células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo y osteoclastos.¹⁻⁶

La matriz extracelular es una red de fibras de proteínas que rodea a las células, agrupadas en capas y permeadas con densas acumulaciones de minerales. Las fibras proteicas proporcionan resistencia y flexibilidad, mientras el contenido mineral proporciona la rigidez.^{1,2} La característica que distingue el tejido óseo de otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz.¹

La matriz extracelular de este material híbrido orgánico-inorgánico, se encuentra compuesta de minerales, colágena, agua, proteínas no colágenas y lípidos. La matriz inorgánica (aproximadamente 70% en peso) está formada por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita (HA) $[Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$, con pequeñas cantidades de carbonato, magnesio, flúor, potasio, sulfato y fosfato ácido. En contraste, la matriz orgánica (aproximadamente 30% en peso) está compuesta principalmente de colágena tipo I con pequeñas cantidades de colágena no fibrilares de tipo III y V. Las fibras de colágena se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, la colágena no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.^{1, 2, 4, 5, 6}

Las proteínas no colágenas incluyen albúmina, α 2-HS-glicoproteína y factores de crecimiento y proteínas no colágenas sintetizadas por osteoblastos (proteoglicanos, proteínas glicosiladas, y proteínas γ -carboxiladas).^{6, 7, 8}

Proteínas no colágenas

Las proteínas no colágenas componen del 10% al 15% de la proteína ósea total, de estas, aproximadamente el 25% de la proteína no colágena se deriva de manera exógena, incluida la albúmina sérica y la glicoproteína α 2-HS, que se unen a la hidroxiapatita debido a sus propiedades ácidas. Las proteínas no colágenas derivadas del suero pueden ayudar a regular la mineralización de la matriz y la glicoproteína α 2-HS, puede regular la proliferación de las células óseas. Las proteínas no colágenas derivadas de forma exógena restantes están compuestas de factores de crecimiento y una gran variedad de otras moléculas en cantidades traza que pueden afectar la actividad de las células óseas.^{6, 7, 8}

Las proteínas no colágenas se dividen ampliamente en varias categorías, que incluyen proteoglicanos, proteínas glicosiladas, proteínas glicosiladas con posibles actividades de unión celular y proteínas γ -carboxiladas (gla). Las funciones de cada una de las proteínas óseas no están bien definidas en la actualidad y muchas parecen cumplir múltiples funciones, incluida la regulación de la deposición mineral ósea y el recambio y la regulación de la actividad de las células óseas.^{6, 7, 8}

La descripción general de las proteínas no colágenas presentes en el tejido óseo se resume en la tabla 1.

Proteína	Función
Proteínas séricas en matriz ósea	
Albumina	Disminuye el crecimiento de cristales de hidroxiapatita.
Glicoproteína α2-HS	Relacionada con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.
Proteínas que contienen glicosaminoglicanos y proteínas ricas en leucina	
Agrecano	Organización matricial y retención de H ₂ O, Ca, PO ₄ .
Versicano	Regula la condrogénesis y define el espacio destinado a osificar.

Decorina	Regula el diámetro de fibrillas de colágeno; se une a TGF- β .
Biglicano	Se une a la colágena, al TGF- β y es un determinante de la masa ósea máxima. Además, puede regular la actividad de factores de crecimiento.
Asporina	Regula la estructura del colágeno.
Hialuronano (complejo multigen)	En conjunto con Versican define el espacio destinado a osificar.
Glicoproteínas	
Fosfatasa alcalina	Hidroliza inhibidores de la deposición mineral y aumenta la concentración local de PO ₄ .
Osteonectina	Regula la organización de la colágena, la deposición de Hidroxiapatita y regula los factores de crecimiento.
Proteínas SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein)	
Osteopontina	Inhibe la mineralización y la remodelación ósea. Se une a las células y controla su proliferación.
Sialoproteína ósea	Inicia el proceso de mineralización.
Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular	Regulador del metabolismo del fosfato.
Glicoproteínas que contienen RGD (secuencia Arg-Gly-Asp)	
Trombospondinas	Adhesión celular, se une a la colágena, plaquetas, trombina, fibrinógeno, laminina, plasminógeno y PAI (Plasminogen Activator).
Fibronectina	Se une a las células y a fibrina, heparina y colágena.
Vitronectina	Adhesión celular y forma enlaces con la colágena, plasminógeno, PAI (Plasminogen Activator) y heparina.
Fibrilina 1 y 2	Regula la formación de fibras elásticas.

Proteínas que contienen ácido γ-carboxi glutámico	
Proteína de matriz Gla	Inhibe la mineralización.
Osteocalcina	Regula los osteoclastos; inhibe la mineralización y puede coordinar el recambio óseo.
Proteína S	Producto hepático, puede ser elaborado por osteoblastos.
Factores de crecimiento	
IGF-I y II (insulin growth factor I y II) TGF-β (Transforming growth factor- beta) PDGF (Platelet derived growth factor)	Intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina.

Tabla 1. Descripción general de proteínas no colágenas presentes en el tejido óseo. Modificado de Clarke, Anders y Fernández.^{6, 7, 8}

Biom mineralización

La biom mineralización es el proceso mediante el cual los organismos vivos producen tejidos mineralizados específicos; esto se logra a través de la deposición de varios iones minerales en el contexto de sustratos orgánicos.⁹

Como se ha mencionado anteriormente, la matriz extracelular (MEC), es el medio que las fibras de colágena proporcionan, donde la HA se nuclea y crece. La nucleación de la hidroxiapatita (HA) se inicia principalmente por un conjunto de proteínas no colágenas fosforiladas y con carga negativa que están asociadas a la MEC. Estas proteínas atraen los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} a través de sus dominios de aminoácidos (AA) cargados y aumentan la sobresaturación local a un nivel suficiente para formar núcleos de un tamaño crítico, que puedan convertirse en cristales de HA.⁹

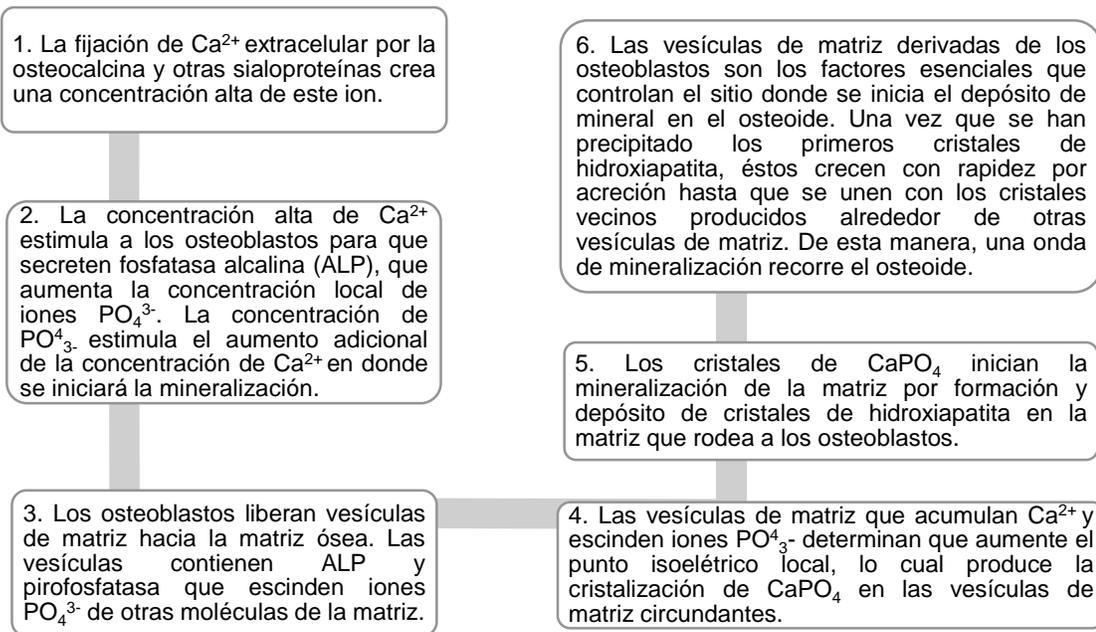
La maduración de la matriz se asocia con la expresión de fosfatasa alcalina y varias proteínas no colágenas, incluidas la Osteocalcina, la Osteopontina y la Sialoproteína ósea. Se cree que estas proteínas de unión a calcio y fosfato ayudan a regular la deposición ordenada de minerales mediante la regulación de la cantidad y el tamaño de los cristales de hidroxiapatita formados.⁹

El mineral óseo se deposita inicialmente en zonas de "orificios" entre los extremos de las fibrillas de colágena. Este proceso puede ser facilitado por vesículas de matriz extracelular en el hueso. Las vesículas extracelulares de la matriz se sintetizan a través de condrocitos y osteoblastos y sirven como microentornos protegidos en los que las concentraciones de calcio y fosfato pueden aumentar lo suficiente para precipitar la formación de cristales. El líquido extracelular normalmente no está sobresaturado con hidroxiapatita, por lo que la hidroxiapatita no precipita espontáneamente. Las vesículas extracelulares de la matriz contienen un núcleo que está compuesto por proteínas y un complejo de fosfolípidos ácidos, calcio y fosfato inorgánico que es suficiente para precipitar los cristales de hidroxiapatita. Aún no está del todo claro cómo las vesículas extracelulares de matriz contribuyen a la mineralización en sitios específicos en los extremos de las fibrillas de colágena, ya que aparentemente las vesículas no están dirigidas directamente a los extremos de las fibrillas.⁹

No hay evidencia de que se formen grupos óseos de fosfato de calcio no cristalino (fosfato de calcio amorfo) en el hueso antes de que se convierta en hidroxiapatita. A medida que el hueso madura, los cristales de hidroxiapatita aumentan y reducen su nivel de impurezas. La ampliación de los cristales se produce tanto por el crecimiento de los cristales como por la agregación. Las macromoléculas de la matriz ósea pueden facilitar la nucleación cristalina inicial, secuestrar iones minerales para aumentar las concentraciones locales de calcio y / o fosfato, o facilitar la nucleación heterogénea. Las macromoléculas también se unen a las superficies de cristal en crecimiento para determinar el tamaño, la forma y el número de cristales formados.⁹

Los promotores de mineralización confirmados (nucleadores) incluyen a la Proteína de matriz 1 de la dentina y la Sialoproteína ósea. Además, otras proteínas como la Fosfatasa alcalina ósea pueden aumentar las concentraciones locales de fósforo, eliminar los inhibidores que contienen fosfato del crecimiento de cristales de hidroxiapatita o modificar las fosfoproteínas para controlar su capacidad de actuar como agentes nucleadores.⁹

En los sitios donde se inicia la mineralización del hueso, la concentración local de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} en la matriz debe superar el nivel umbral normal. Los eventos más relevantes durante el proceso de mineralización se describen en el cuadro número 1.¹



Cuadro 1. Eventos relevantes que ocurren durante el proceso de biomineralización¹

Estudios *in vitro* han demostrado que similar a las proteínas, los aminoácidos con carga son capaces de inhibir o inducir a la mineralización de la hidroxiapatita; aminoácidos como el Ácido aspártico (Asp), Ácido glutámico (Glu) y Fosfoserina son muy abundantes en el dominio ácido de las proteínas no colágenas (Osteopontina, Sialoproteína ósea, Proteína de la matriz dentinaria) involucradas en la mineralización de la hidroxiapatita en hueso y dentina. Además, estudios recientes han demostrado que los aminoácidos (AA) con carga tanto positiva como negativa están presentes en la zona del orificio del colágeno, donde la HA se nuclea de forma intrafibrilar. La presencia de estos AA en estas áreas parece ser crucial para interactuar con los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} necesarios para la precipitación de HA.⁹

En la tabla 2 podemos observar la presencia importante de los aminoácidos cargados negativamente: Ácido glutámico (E) y Ácido aspártico (D) en algunas de las proteínas no colágenas involucradas en el proceso de mineralización:

Secuencia de aminoácidos	Proteína
EEEEEEGN (150-160)	BSP (P21815) (Sialoproteína ósea)
EEQADSESE (400-410)	DMP (Q13316) (Fosfoproteína de la matriz de dentina)
EDDDHVD SQ (90-100)	OPN (P10451) (Osteopontina)
CVEEQRQEEK (40-50)	MEPE (Q9NQ76) (Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular)

Tabla 2. Regiones ácidas de proteínas asociadas a la biomineralización. Secuencias obtenidas de Uniprot.org ¹⁰

Lesiones en tejido óseo

La pérdida o trastorno óseo por trauma, osteonecrosis y tumores, causa una morbilidad significativa y afecta la calidad de vida del paciente. Es por ello que se han buscado alternativas para brindar apoyo, llenar espacios y mejorar la regeneración de los defectos óseos, tradicionalmente, los autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y los injertos de ingeniería de tejidos son los que se usan comúnmente para reemplazar el hueso perdido o dañado. ^{11, 12, 13, 14}

El hueso autógeno es el estándar de oro que todas las alternativas de tratamiento deben cumplir, sin embargo, éste tiene limitaciones importantes, como lo son: la morbilidad del sitio donante, la cantidad inadecuada y la forma inapropiada; es por ello que existe un interés creciente en injertos óseos alternativos. ^{11, 14}

Aunque los aloinjertos son fuentes atractivas, existen varios problemas encontrados al usarlos, incluido el riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad, pérdida de propiedades biológicas y mecánicas secundarias a su procesamiento, además de mayor costo. En consecuencia, se están realizando esfuerzos significativos para desarrollar sustitutos ideales del injerto óseo. ^{11, 13, 14,}

Los tejidos óseos descelularizados (xenoinjertos) se utilizan como un almacén óseo potencial para la regeneración esquelética, ya que la matriz extracelular ósea posee la estructura ósea nativa, así como propiedades osteoinductoras y biomecánicas.^{11, 14}

Con el objetivo de encontrar más alternativas de tratamiento de los defectos óseos, así como buscar un material que presente menos limitaciones, surge la ingeniería de tejidos, que busca crear continuamente, estructuras portadoras que regeneren y restauren el estado funcional óseo. Estas estructuras abarcan factores de crecimiento, andamios biológicos en evolución e incorporación de células madre mesenquimatosas, proteínas y péptidos.^{11, 12, 13, 14}

Andamios

Son estructuras tridimensionales que construyen un microambiente nativo para el tejido u órgano lesionado, que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas, transduce señales biológicas para reparación y regeneración, y guía la reconstrucción del tejido.^{11, 12, 14}

Las células interactúan con estos dispositivos de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento, mientras que sintetizan su propia matriz extracelular (MEC), que proporciona un ambiente y arquitectura específicos del tejido, y sirve como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento.^{11, 12, 14}

Los polímeros derivados naturalmente como la colágena, el alginato y el ácido hialurónico, son una amplia clase de redes poliméricas reticuladas que absorben gran cantidad de agua o cualquier otro fluido biológico sin mostrar ninguna alternancia en su arquitectura tridimensional, imitan el tejido huésped nativo y se usan ampliamente para la fabricación de andamios tridimensionales, su función, es apoyar el crecimiento y la proliferación celular.¹²

En cuanto a las características fundamentales que debe tener un andamio para poder interactuar de manera favorable en el organismo son:¹¹

- **Biocompatibilidad.** Integración adecuada al tejido hospedero sin presentar efectos tóxicos o causar respuesta inmune.

- Porosidad. Poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes y gases y para la remoción de desechos metabólicos como resultado de la actividad celular.
- Propiedades de la superficie. Químicas como topográficas pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular; las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material. Las propiedades topográficas son fundamentales para la osteoconducción.
- Osteoinductividad. Reclutamiento de células madre y osteoprogenitoras en el sitio de regeneración ósea y estimulación para diferenciarse hacia la línea osteogénica;
- Resistencia mecánica.
- Biodegradabilidad. Con tasas de degradación que igualen a las de formación ósea.

Alginato

El alginato es una biomolécula binaria, copolimérica lineal aniónica que contiene bloques de residuos de β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G) con enlaces (1,4); ésta asemeja la estructura de los glicosaminoglicanos, uno de los principales componentes de la matriz extracelular en el tejido humano. El alginato es abundante en la naturaleza y se puede encontrar como componente estructural de las algas marinas pardas y como polisacárido estructural de las bacterias.^{4, 15, 16}

Es un biomaterial ampliamente investigado y utilizado para muchas aplicaciones biomédicas, debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, costo relativamente bajo y gelificación leve mediante la adición de cationes divalentes como Ca^{2+} . Los hidrogeles de alginato pueden prepararse mediante diversos métodos de reticulación, y su similitud estructural con las matrices extracelulares de tejidos vivos permite una amplia aplicación.^{4, 15, 16}

El método más común para preparar hidrogeles a partir de una solución acuosa de alginato es combinar la solución con agentes de reticulación iónicos, como los cationes divalentes (es decir, Ca^{2+}). Se cree que los cationes divalentes se unen únicamente a los bloques de guluronato de las cadenas de alginato. Los bloques de guluronato de un polímero luego forman uniones con los bloques de guluronato de las

cadenas de polímeros adyacentes en lo que se denomina “el modelo de caja de huevos de reticulación”, que resulta en una estructura de gel. El cloruro de calcio (CaCl_2) es uno de los agentes más utilizados para reticular iónicamente el alginato.⁴

15, 16

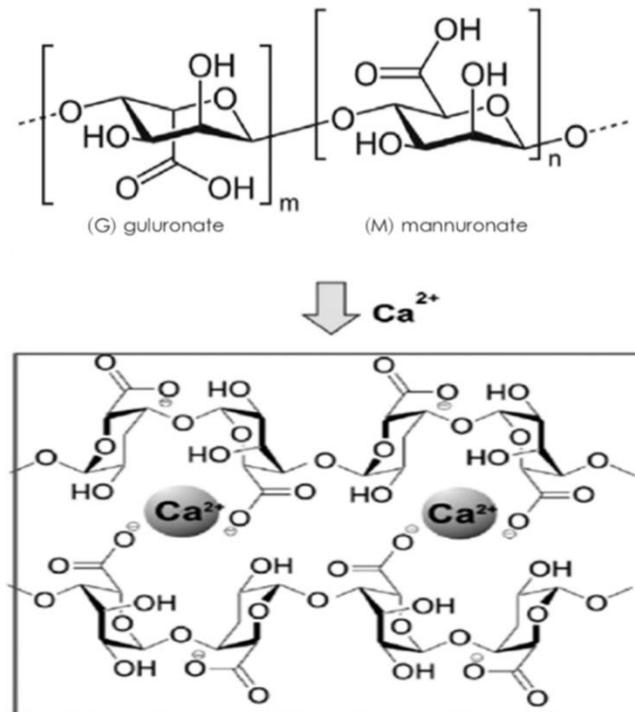


Figura 1. “Modelo de la caja de huevo de la reticulación” del alginato propiciada por calcio en solución

Los andamios de alginato tridimensionales (hidrogeles, microesferas, microcápsulas, esponjas, espumas y fibras) se han utilizado ampliamente como portadores de células en la ingeniería de tejidos debido a sus propiedades hidrofílicas, su estructura tridimensional porosa, su excelente compatibilidad con los tejidos, baja toxicidad, biodegradabilidad, ser inerte y no interactuar con sistemas biológicos en el huésped, capacidad de quelación, gelificación suave mediante la adición de cationes divalentes como el Ca^{2+} , resistencia mecánica, adhesión y proliferación celular, aumento de fosfatasa alcalina, excelente mineralización y diferenciación osteogénica; además de su costo relativamente bajo.^{4, 15, 16}

Colágena tipo I

La colágena tipo I es la proteína más abundante en la matriz extracelular (MEC), tiene una estructura que favorece la deposición de minerales y se une a las proteínas de la matriz no colágena, que inician y controlan la mineralización por sí mismas. La colágena se ha considerado un grupo de proteínas con una estructura molecular característica: la estructura fibrilar, que contribuye al andamiaje extracelular. Es decir, la colágena juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad biológica y estructural de la MEC y proporciona soporte físico a los tejidos.^{13, 17}

Además, la colágena ofrece baja inmunogenicidad, una estructura porosa, permeabilidad, buena biocompatibilidad y biodegradabilidad y tiene funciones para regular la morfología, adhesión, migración y diferenciación de las células. Todos estos buenos resultados hacen que este polímero natural parezca ser un biomaterial prometedor para los andamios en la ingeniería de tejidos. Sin embargo, los andamios de colágena carecen de resistencia mecánica y estabilidad estructural tras la hidratación, lo que limita sus aplicaciones en tejidos particulares. La reticulación intermolecular de los andamios de colágena se puede lograr por métodos físicos o químicos, que pueden mejorar las propiedades mecánicas del andamio.^{13, 17}

Los biomateriales a base de colágena pueden originarse a partir de dos técnicas fundamentales. El primero es una matriz de colágena descelularizada (altamente purificado obtenido de la dermis) que preserva la forma original del tejido y la estructura de la MEC, mientras que la otra se basa en la extracción, purificación y polimerización de la colágena y sus diversos componentes para formar un andamio funcional. Ambas técnicas pueden someterse a varios métodos y protocolos de entrecruzamiento que son aplicables a una amplia variedad de fuentes de tejidos y especies de origen.^{13, 17, 18}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento de las lesiones óseas es a menudo limitado debido a que el proceso de mineralización es complejo, pues requiere la organización espacial y temporal de diversas moléculas tanto orgánicas como inorgánicas. Presentándose situaciones donde únicamente se produce la reparación del tejido óseo afectado, pero no una regeneración de este. Por lo tanto, es importante el diseño y la búsqueda de tratamientos que faciliten y promuevan el proceso de regeneración ósea.

JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes han demostrado que los AA cargados están presentes en la zona de colágena donde la HA se nuclea intrafibrilarmente, además de estar presentes en diversas proteínas asociadas al proceso de mineralización. La presencia de estos aminoácidos en estas áreas parece ser crucial para interactuar con los iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} necesarios para la precipitación de la HA, es por ello que proponemos el desarrollo de andamios (que funcionen como una matriz tridimensional en la cual las células remanentes podrán proliferar) a base de alginato de sodio, colágena tipo I de rata y colágena comercial que permitan la incorporación, liberación controlada y administración localizada de aminoácidos favoreciendo la biomineralización en defectos óseos.

HIPÓTESIS

Los aminoácidos (Ácido glutámico y Fenilalanina) incorporados en los diferentes andamios: Alginato de sodio, Colágena tipo I autógena y Colágena xenogénica favorecerán la mineralización en defectos óseos.

OBJETIVOS

General

Evaluar si los aminoácidos (Ácido glutámico y Fenilalanina) incorporados a los andamios de alginato, colágena autógena y colágena xenogénica, favorecen el proceso de biomineralización en defectos óseos de tamaño crítico en calvaria de rata Wistar.

Específicos

- a) Elaborar andamios de Alginato de sodio, Colágena I autógena y Colágena xenogénica adicionados con los respectivos aminoácidos (Ácido glutámico y Fenilalanina).
- b) Determinar las características microscópicas de los diferentes andamios (Alginato de sodio, Colágena autógena y xenogénica) mediante microscopia electrónica de barrido.
- c) Determinar *in vitro* mediante el sistema de contradifusión en gel de silicato el efecto de los aminoácidos (Ácido glutámico y Fenilalanina) en la mineralización de cristales de fosfato de calcio.
- d) Realizar el procedimiento quirúrgico de defecto de tamaño crítico en calvarias de rata Wistar e implantar los andamios (Alginato de sodio, Colágena autógena y xenogénica).
- e) Realizar la eutanasia y procesar las muestras de tejido para su análisis mediante tinción tricrómica de Masson e inmunofluorescencia para identificar BSP.
- f) Realizar el análisis de resultados (porcentaje de regeneración ósea) mediante histomorfometría.

METODOLOGÍA

En este estudio se requirieron 36 ratas macho de la cepa Wistar de entre 11 y 12 semanas de edad, con un peso entre 250 y 300 gramos.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, cada grupo asignado para un andamio distinto (Alginato, Colágena autógena y Colágena xenogénica):

Aminoácido Andamio	Control	Experimentales		
		Ácido glutámico	Fenilalanina	Ácido glutámico + Fenilalanina
Alginato de sodio	3 ratas	3 ratas	3 ratas	3 ratas
Colágena autógena	3 ratas	3 ratas	3 ratas	3 ratas
Colágena xenogénica	3 ratas	3 ratas	3 ratas	3 ratas

Fase 1. Elaboración de los andamios

Andamios de alginato

Para la confección de estos andamios se realizó una solución de 50 mL en agua desionizada estéril de alginato de sodio de media viscosidad al 2% (Sigma-Aldrich, United Kingdom) y una solución de 100 mL de cloruro de calcio (MP Bio, France) a concentración de 100 mM.

Una vez preparadas las dos soluciones, se realizó la mezcla en un tubo eppendorf de 500 μ L de CaCl_2 a una concentración de 10 mM y 500 μ L de alginato de sodio al 2%. A esta solución se le añadió 1 mg (por andamio) de Ácido glutámico, Fenilalanina o Ácido glutámico + Fenilalanina, según fuera el caso.

Se armaron moldes con máscaras de neopreno grado alimenticio de 75 mm x 25 mm (en los cuales se realizaron dos perforaciones circulares de 9 mm de diámetro cada una) cuya base fue un portaobjetos fijado con pinzas. En el fondo del molde se agregaron 30 μ L de CaCl_2 100 mM y se colocaron 300 μ L de la solución de alginato con cloruro de calcio y el correspondiente aminoácido contenida en el tubo eppendorf (evitando la formación de burbujas); los moldes con la solución se congelaron a -80°C durante 5 minutos, transcurrido este periodo de tiempo, las muestras se retiraron del ultracongelador y se les colocó en la parte superior 500 μ L de CaCl_2 100mM hasta

que las muestras descongelaran (5 min aproximadamente). Se retiró el excedente de la solución de calcio y las muestras se retiraron de los moldes. Las muestras se congelaron a -20°C y posteriormente se liofilizaron (Labconco Freeze Dryer 5) durante 6 horas. Una vez libres de agua, los andamios se empaquetaron en bolsas individuales y se esterilizaron mediante luz UV (Spectroline™ Microprocessor-Controlled UV Crosslinkers) con exposición de 120 mJ/cm² por 25 minutos de cada lado.

Andamios de colágena tipo I obtenida de tendón de cola de rata

Protocolo para la obtención de colágena tipo I de colas de rata según Jiménez Santos:¹⁹

Importante: siempre mantener la colágena en una solución fría (4°C).

- Seleccionar 5 colas de rata (almacenadas a -20°C) y desinfectarlas con etanol al 70% dejándolas completamente sumergidas. Los especímenes provienen de animales de bioterio usados para condiciones de control sin tratamientos de otras investigaciones y que fueron donados para la realización de este trabajo.
- Remover y desechar la piel.
- Remover los tendones de la cola y colocarlos en etanol al 70%.
- Pesar los tendones y agregar una solución de ácido acético pre-enfriada al 0.5 M, en un volumen de 500 ml.
- Dejar agitar a 4°C durante 48-72 Horas.
- Centrifugar a 4°C a 7500 rpm durante 30 minutos, posteriormente descartar el pellet.
- Agregar un volumen de 500 mL de solución con NaCl al sobrenadante para precipitarlo a 4°C, dejar que el proceso se realice durante la noche y al día siguiente la colágena suspendida en la parte superior será mucho más fácil extraerlo.
- Recoger la colágena insoluble por centrifugación durante 30 minutos a 7500 rpm a 4°C.

- Descartar el sobrenadante y resuspender el botón en ácido acético a una concentración de 0.25 M (dejar toda la noche en el agitador magnético en una cámara fría); no agregar mucho ácido acético ya que puede diluir el colágeno.
- Dializar contra solución diluida de ácido acético (1:1000; 1ml por L) a 4°C durante tres días y cambiar el buffer dos veces por día, usar una membrana de 12-14 kDa.
- Clarificar la muestra por centrifugación durante 2hrs a 7, 500 rpm.
- Alicuotar en tubos Eppendorf y liofilizar.
- Almacenar en contenedor estéril a 4°C.

Andamios de colágena tipo I autógena

Se prepararon diluciones de colágena tipo I en PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4 a concentración 21 mg/mL a partir de una concentración de 36 mg/mL. A cada solución se le añadió 1 mg (por andamio) de Ácido glutámico, Fenilalanina y Ácido glutámico + Fenilalanina, según fuera el caso. Posteriormente se armaron moldes con la máscara de neopreno cuya base fue un portaobjetos a la medida fijado. Se cargó la micro pipeta con 300 µL de solución de colágena para depositar en cada molde, evitando la formación de burbujas. Cargados los moldes, se congelaron las muestras a -20°C. Se liofilizaron durante 6 horas. Los andamios liofilizados fueron empaquetados en bolsas individuales y esterilizados mediante luz UV (Spectroline™ Microprocessor-Controlled UV Crosslinkers) con exposición de 120 mJ/cm² por 25 minutos de cada lado.

Andamios de colágena xenogénica (Surgispon®)

Se cortaron discos de *Surgispon* a un diámetro de 11 mm, hecho esto se preparó la solución de agua desionizada añadiendo 1 mg de cada aminoácido (por andamio): Ácido glutámico, Fenilalanina o Ácido glutámico + Fenilalanina según sea el caso.

Posteriormente se colocaron 200 µL de la solución en cada disco de *Surgispon* y se introdujeron a la cámara de vacío. Una vez deshidratados se empaquetaron en bolsas individuales, se esterilizaron mediante luz UV (Spectroline™ Microprocessor-Controlled UV Crosslinkers) con exposición de 120 mJ/cm² por 25 minutos de cada lado.

Todos los pasos para la elaboración de los andamios se llevaron a cabo bajo condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar (Air Science PCR) y con el uso de agua e instrumentos esterilizados por autoclave.

Microscopia electrónica de barrido de los andamios

Una vez obtenidos los andamios, fueron sometidos (1 andamio por grupo) a microscopia electrónica de barrido (SEM), con el fin de observar su microestructura.

La preparación previa a la obtención de las microfotografías, fue cortar coronalmente cada uno de los andamios, realizar la desecación química y posteriormente el secado al punto crítico (mediante la secadora de punto crítico EM CPD300, Leica). Una vez realizado este procedimiento, se llevó a cabo el recubrimiento de las muestras con oro en un equipo DESK II, Denton Vacuum y finalmente, fueron colocadas cada una de las muestras para su visualización a 100 X y 600 X mediante el microscopio electrónico de barrido EVO-50 Carl Zeiss.

Fase 2. Pruebas *in vitro* y estudios de microscopia

Para dilucidar cómo es que las proteínas no colágenas y otras biomoléculas actúan en el proceso de biomineralización, se han diseñado estudios *in vitro* de mineralización (precipitación en geles) que buscan aportar información acerca del mecanismo de acción de las biomoléculas a analizar y por tanto, dilucidar la función que tienen *in vivo*.²¹

En este caso, se utilizó un sistema de contradifusión en gel de silicato que permitiera determinar si los aminoácidos: Ácido glutámico, Fenilalanina y la mezcla de ambos, tienen la capacidad de actuar como nucleadores y/o reguladores de cristales de fosfatos de calcio. Este sistema, permite incorporar los aminoácidos en gel a temperatura (37 °C) y pH fisiológicos (7.4) y que estos permanezcan estables durante el experimento. El gel, no interacciona con el proceso, lo que permite conocer el efecto de la biomolécula por sí sola, además de aportar información de la nucleación de cristales de *novo*, la nucleación heterogénea y la regulación del crecimiento de los cristales.

➤ Fórmula para preparar gel de silicato de sodio:

- 2 mL de Metasilicato de sodio 1.06 gr/mL
- 1.8 mL de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) buffer 10 mM pH 7.4
- 0.2 mL de HEPES buffer 10 mM pH 7.4 más azida de sodio 1%
- 1.8 mL de H_3PO_4 1 M
- 20 $\mu\text{g/mL}$ de Ácido glutámico, Fenilalanina o la mezcla de ambos (20 $\mu\text{g/mL}$ de Ácido glutámico + 20 $\mu\text{g/mL}$ de Fenilalanina) según fuera el caso para los grupos experimentales.
- 20 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino (BSA Sigma St Louis MO) para el control negativo.
- El grupo control sin agregar proteína.

➤ Solución de Cloruro de Calcio:

- 100 mM de cloruro de calcio en HEPES buffer 10 mM pH 7.4

Formación de cristales de fosfato de calcio

El sistema para la formación de los cristales de fosfato de calcio consistió en un casete formado por dos vidrios de 7 cm x 9 cm x 3 mm, separados por un marco de neopreno de 3 mm de grosor. El marco se ajustó a los vidrios, se selló con silicón de vacío y sujetadores metálicos para evitar fugas.

Se preparó la solución que formaría el gel de silicato y en estado líquido se agregaron 5 mL al interior del sistema, los cuales incluían 100 $\mu\text{g/ml}$ de cada aminoácido, solos y en combinación. Posterior a la gelificación de éste, se llenó el sistema con la solución de cloruro de calcio (5 mL) y se selló el sistema incubándolo 30 días a 37°C.



Figura 2. Sistema de contradifusión en gel de silicato.²⁶

Recuperación de los cristales

Transcurrido el periodo para el crecimiento de los cristales, se recuperaron del gel de silicato; estos fueron recolectados manualmente del gel con MicroMounts de 150 μm (MiTeGen Ithaca, NY) y almacenados en tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior procesamiento y análisis con microscopía electrónica de barrido.

Microscopía electrónica de barrido de los cristales formados

La determinación de la morfología de los cristales formados en el sistema de contradifusión en gel de silicato, fue realizada con el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM) Leica-Cambridge Modelo StereoScan 440.

Fase 3. Cirugía de defectos óseos en calvaria de rata

Procedimiento quirúrgico de 36 ratas Wistar macho de entre 11 y 12 semanas de edad, con un peso entre 250 y 300 g (las ratas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos ya mencionados al inicio de la metodología).

Instrumental y materiales

- Mepivacaína 2% con epinefrina 1:100 000
- Aguja 27 G
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Yodopovidona
- Vycril 4-0
- Jeringa de 20 mL y aguja hipodérmica 21G
- Gasas estériles
- Mango de bisturí # 3
- Hoja de bisturí # 15
- Satín hemostático absorbible
- Carpule
- Legra de Molt
- Motor quirúrgico (NSK®)
- Contrángulo para motor quirúrgico
- Trefina de 9 mm de diámetro
- Cíncel
- Pinzas de Adson sin dientes
- Portagujas
- Tijeras para corte de sutura

Preparación preoperatoria:

Se esterilizó de todo el material requerido en autoclave y se realizó la desinfección del campo.

Se indujo la sedación utilizando Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg), ambas por vía intramuscular; se realizó tricotomía de la zona quirúrgica y antisepsia de rutina con yodopovidona; posteriormente, se aplicó 0.5 mL de anestesia en la zona quirúrgica (Mepivacaína al 2% con epinefrina 1:100000).

Procedimiento quirúrgico:

1. Se realizó una incisión lineal de 3 cm sobre el cuero cabelludo desde el hueso nasal hasta la parte caudal de la cresta sagital media o bregma, hasta exponer el vértice craneal.
2. Se separó con retractor para lograr una exposición quirúrgica ósea que previniera lesiones de tejidos blandos / periostio durante la trefinación de la calvaria.
3. Se creó el defecto óseo crítico por medio de una trefina de 9 mm de diámetro montada en un motor para implantes a 1,800 rpm irrigando abundantemente con solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS) para remover detritos.
4. Se realizó el clivaje del fragmento óseo con ayuda de un cincel, teniendo especial cuidado de no dañar la duramadre.
5. Se irrigó la zona con PBS para la remoción de detritos.
6. Se implantó el andamio anteriormente confeccionado evitando presión excesiva en el sitio del defecto.
7. Se suturó mediante puntos simples con Vycril 4-0.
8. Una vez terminada la cirugía, se limpió cuidadosamente la cabeza con PBS para eliminar restos de sangre.
9. Se transfirió a cada una de las ratas a una incubadora calentada con oxígeno suplementario, al completar la observación, las ratas se transfirieron a jaulas de cría normales (alimentación con Rodent Diet 5001 *ad libitum*) hasta la eutanasia.

Eutanasia

Al término del periodo, se utilizó monóxido de carbono durante 5 minutos o hasta que los movimientos del animal cesaran.

Fase 4. Procesamiento histológico y análisis de resultados

Una vez cumplidos los 4 meses, se evaluó la mineralización mediante procesamiento histológico, tinciones específicas, marcadores inmunohistoquímicos y análisis morfométrico.

Preparación para el análisis histológico

1. Se hizo una marca de referencia, como una muesca, en el hueso fuera del área del defecto para asegurar una correcta orientación en el análisis posterior.
2. Se realizó la fijación del tejido proveniente de la calvaria con formaldehído al 10% por 24 horas.
3. Se descalcificó en formaldehído con ácido nítrico al 5% por 60 horas, y finalmente se embebió en parafina.
4. Se realizaron cortes secuenciales para teñir con Tricrómica de Masson.
5. Se utilizaron cortes en blanco para realizar la tinción inmunohistoquímica para identificación de un anticuerpo contra la proteína Sialoproteína ósea y posteriormente, evaluar el resultado en un microscopio para fluorescencia.

Análisis histomorfométrico

El análisis histomorfométrico se realizó en las reconstrucciones panorámicas obtenidas de las laminillas procesadas; utilizando el software Zen Lite (Carl Zeiss) se calculó el número de píxeles de las zonas donde había neoformación ósea; una vez obtenidos los valores, se contrastó con la reconstrucción panorámica del fragmento óseo obtenido del clivaje en la cirugía. El valor de los píxeles obtenidos de esta muestra fueron utilizados como el 100%, para así mediante una regla de tres, conocer el porcentaje de hueso formado en los defectos.

Inmunofluorescencia

Se utilizaron cortes en blanco para realizar la tinción inmunofluorescencia para identificación de Sialoproteína ósea (BSP) en los siguientes grupos:

- Alginato control.
- Alginato + Ácido glutámico
- Alginato + Ácido glutámico + Fenilalanina
- Colágena autógena + Ácido glutámico
- Colágena xenogénica + Ácido glutámico
- Colágena xenogénica + Fenilalanina

Se realizó el protocolo para la desparafinización de los tejidos de las laminillas, siguiendo la secuencia que se menciona a continuación:

Solución	Concentración	Tiempo
Xylol	80%	10 minutos
Xylol	70%	10 minutos
EtOH	100%	3-5 minutos
EtOH	95%	3-5 minutos
EtOH	70%	3-5 minutos
EtOH	50%	3-5 minutos
PBS	dos lavados	3-5 minutos

Se realizó doble tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos policlonal de conejo y cabra contra BSP y monoclonal contra BSP (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA). Los cortes fueron tratados con BSA al 2% en PBS por una hora a temperaturas ambientes e incubados en diluciones 1:100 de los anticuerpo monoclonales por 2 horas a 4 °C. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS con Tween 20 al 0.1% dos veces y un lavado con PBS por 5 minutos cada uno. Al terminar, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario conjugado FITC-anti-ratón, diluido 1:50 durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras fueron evaluadas utilizando un microscopio para fluorescencia (Axioskope 2, Carl Zeiss, Germany) con la combinación de filtros apropiados.

Análisis estadístico

Una vez obtenidos los porcentajes en píxeles del tejido óseo neoformado mediante el software ZEN Lite (Carl Zeiss, Germany) en las reconstrucciones de los cortes histológicos (2 muestras por grupo) haciendo la comparación con el fragmento total óseo obtenido del clivaje transoperatorio (100%); se realizó el análisis estadístico de varianza ANOVA y se compararon todas las columnas obtenidas a través del test de Bonferroni. Ambos análisis se realizaron en el software GraphPad 8 (GraphPad Software Inc. USA).

RESULTADOS

Fase 1. Elaboración de los andamios

A continuación, se muestra la imagen macroscópica de los andamios realizados, cuya medida son 9 mm de diámetro.

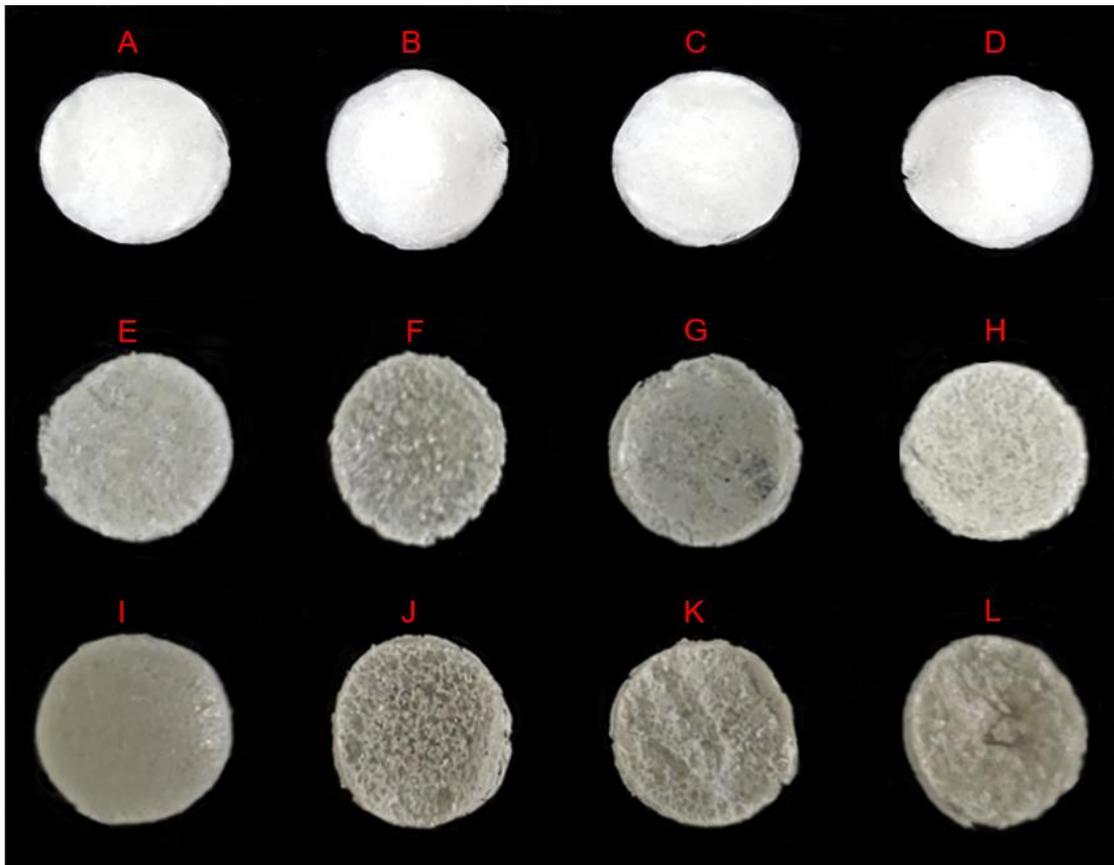


Figura 4. Vista macroscópica de los andamios:

A) Alginato control, B) Alginato + Ácido glutámico, C) Alginato + Fenilalanina, D) Alginato + Ácido glutámico + Fenilalanina.

E) Colágena autógena control, F) Colágena autógena + Ácido glutámico, G) Colágena autógena + Fenilalanina, H) Colágena autógena + Ácido glutámico + Fenilalanina.

I) Colágena xenogénica control, J) Colágena xenogénica + Ácido glutámico, K) Colágena xenogénica + Fenilalanina, L) Colágena Xenogénica+ Ácido glutámico + Fenilalanina.

Fuente propia

Microscopia electrónica de barrido de los andamios

Una vez obtenidos los andamios y seleccionados (uno de cada grupo), se sometieron a microscopia electrónica de barrido (SEM), a fin de observar su estructura.

Las microfotografías obtenidas muestran estructuras porosas (con tamaños variables de los poros, aproximadamente 150 μm) cuyas funciones principales son la adhesión, proliferación y migración celular.

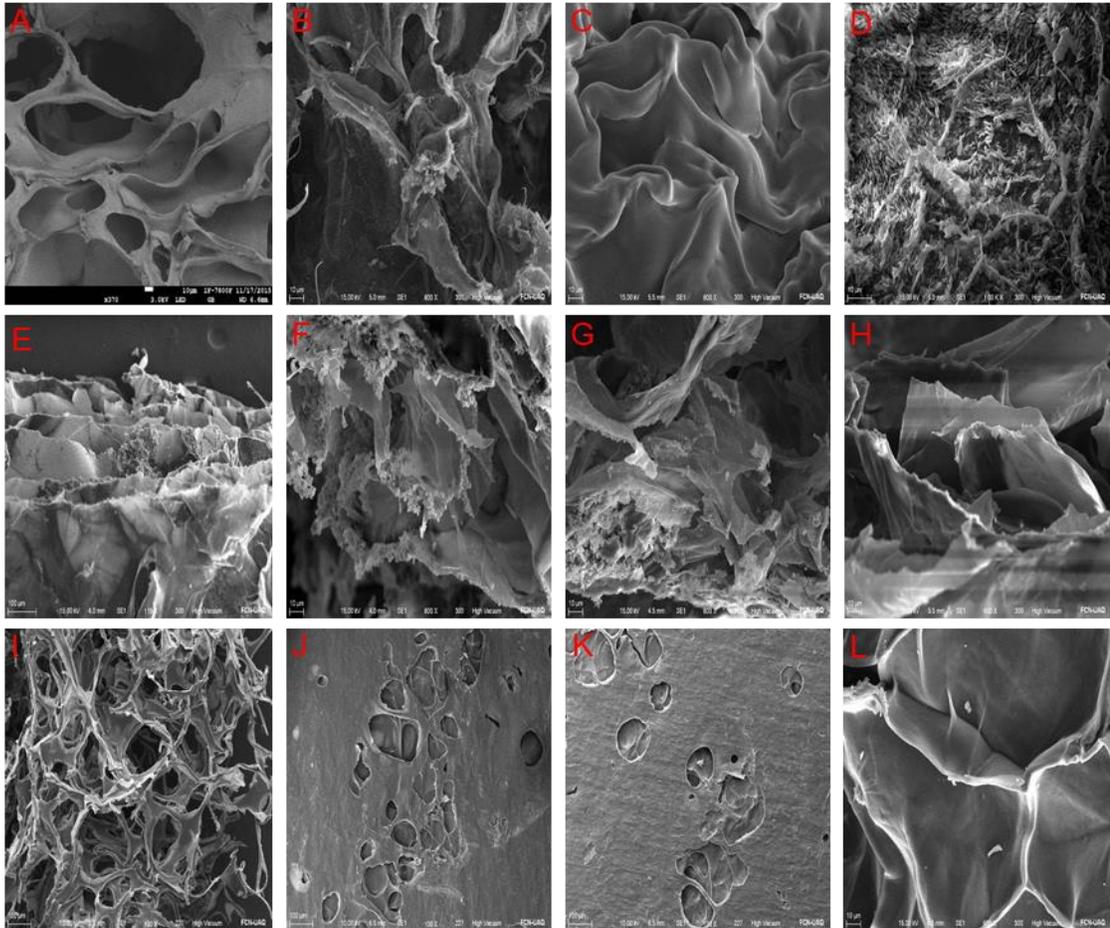


Figura 5. Microfotografías obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) de los distintos andamios:

A) Alginato control, B) Alginato + Ácido glutámico, C) Alginato + Fenilalanina, D) Alginato + Ácido glutámico + Fenilalanina.

E) Colágena autógena control, F) Colágena autógena + Ácido glutámico, G) Colágena autógena + Fenilalanina, H) Colágena autógena + Ácido glutámico + Fenilalanina.

I) Colágena xenogénica control, J) Colágena xenogénica + Ácido glutámico, K) Colágena xenogénica + Fenilalanina, L) Colágena Xenogénica+ Ácido glutámico + Fenilalanina.

Fuente propia

Fase 2. Pruebas in vitro de mineralización y estudios de microscopía

Posterior a los ensayos de formación de cristales de fosfato de calcio y la recolección de los mismos, se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Esta herramienta permitió determinar la morfología tridimensional de los cristales formados en presencia de los aminoácidos y de los grupos controles con BSA y sin proteína (figura 8).

En las microfotografías se observó la morfología que los cristales adquieren en presencia de Ácido glutámico, Fenilalanina y Ácido glutámico + Fenilalanina a los 30 días de incubación. Se formaron estructuras esféricas de aproximadamente 200 micras de diámetro conformadas de múltiples cristales que emergen del centro del cristal. Dichas estructuras son características de proteínas asociadas al proceso de mineralización (figura 7).

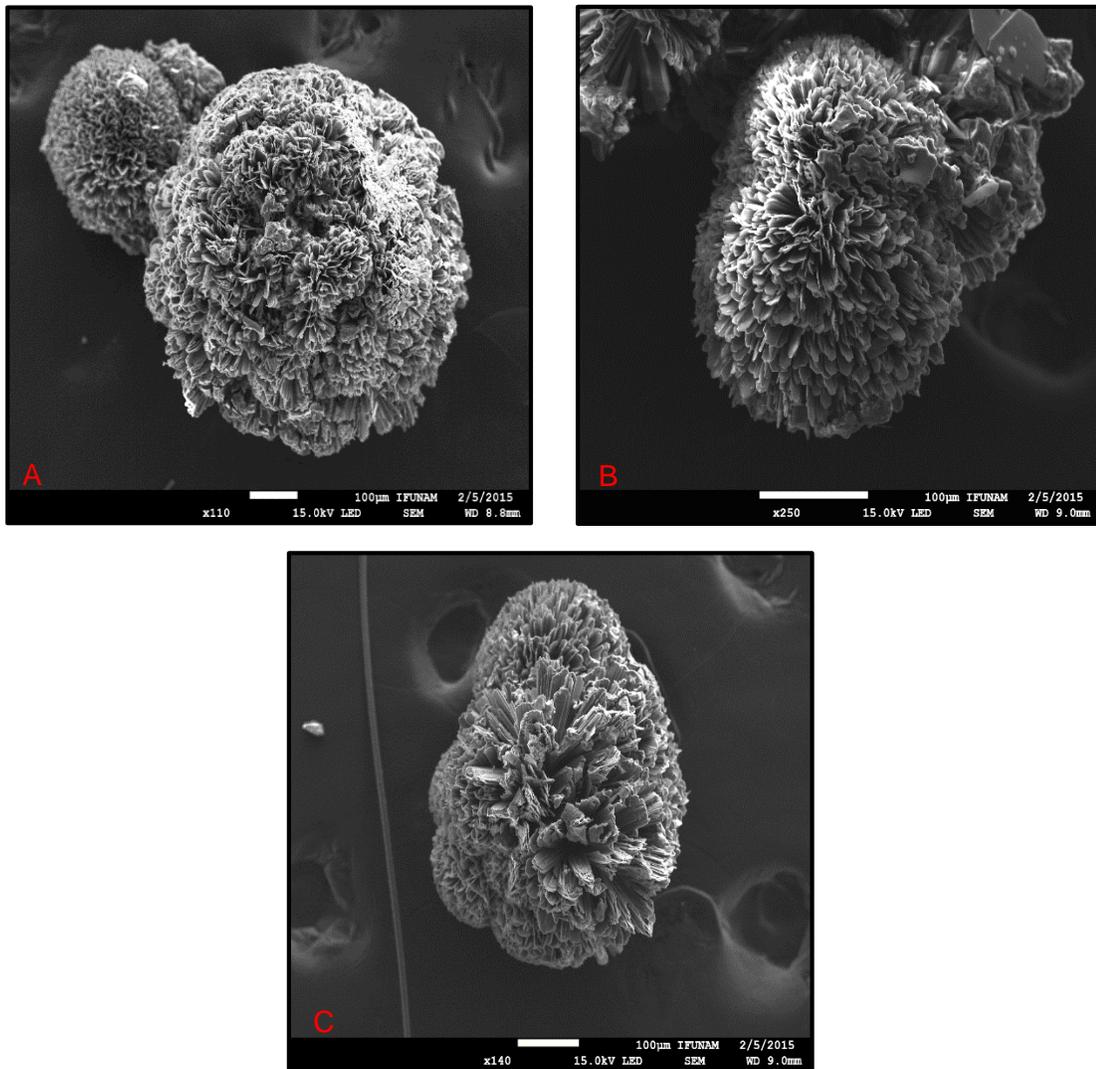


Figura 6. Imágenes obtenidas por medio de microscopio electrónico de barrido; muestran la formación de una fase mineral al colocar: A) Ácido glutámico, B) Fenilalanina y C) Ácido glutámico y Fenilalanina a una concentración de 100 µg/ mL en un sistema de contradifusión en gel de silicato, en condiciones de incubación específicas (30 días, 37 °C).

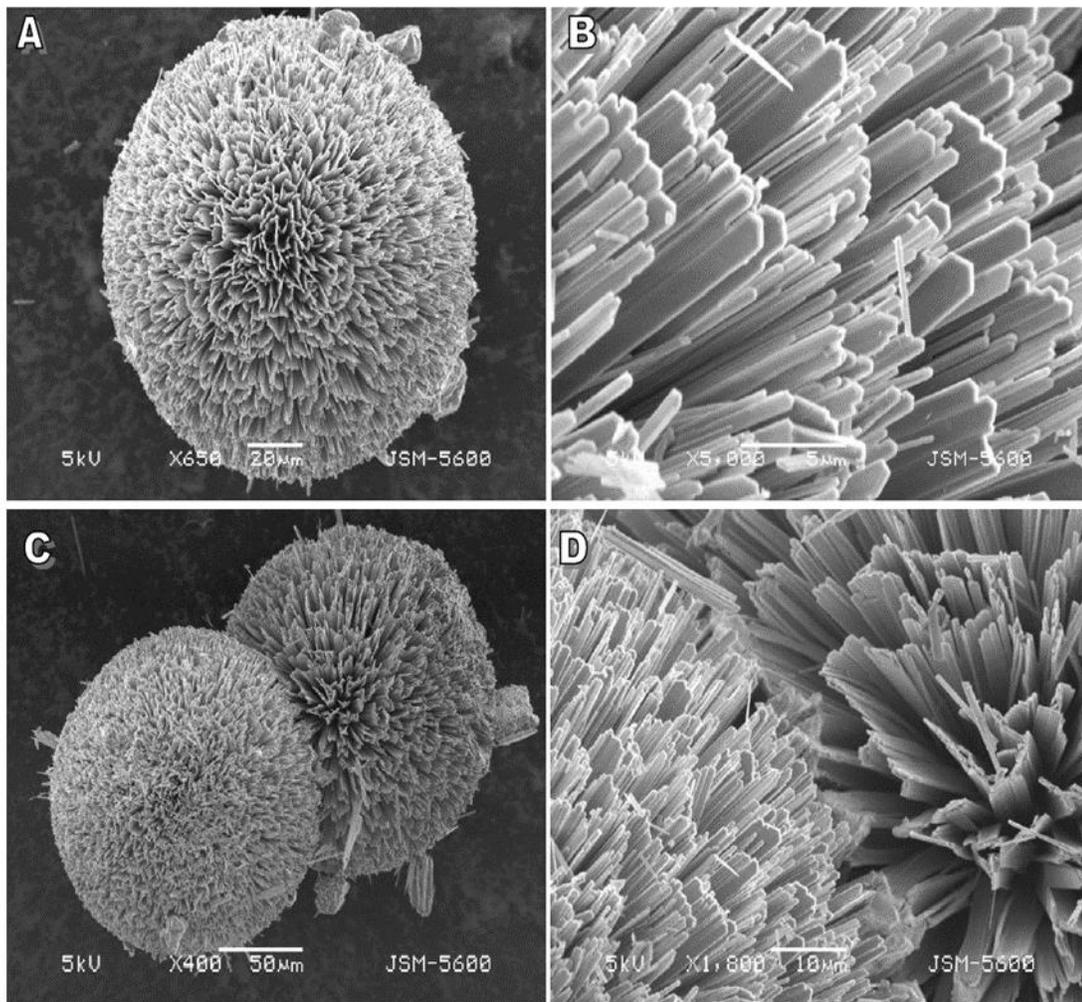


Figura 7. Microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM); se muestran la formación de los cristales obtenidos en el sistema de contradifusión en gel de silicato inducidos con hrCEMP1.

A y C) muestran esférulas con un diámetro de 130-150 μm formadas en presencia de hrCEMP1 a los 14 días de incubación.

B y D) muestran la superficie de las esférulas (A y C respectivamente), constituidas por múltiples cristales alargados en forma de fideos, teniendo un origen común en el centro de la esférula.²²

Las microfotografías muestran la morfología de las estructuras formadas después de 30 días de incubación (sin proteína y con BSA, respectivamente). En ambos casos se observan placas de un grosor promedio de 10 μm y una longitud variable con bordes irregulares.

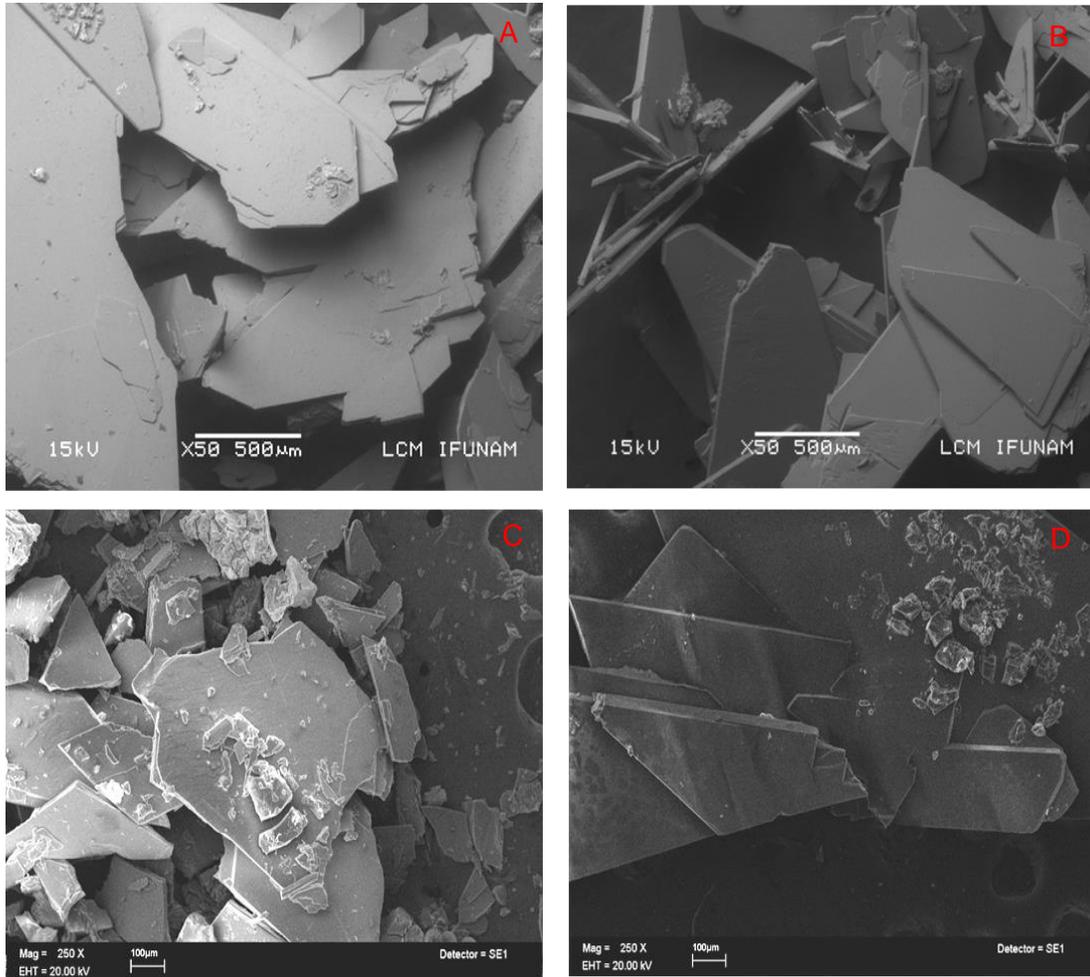


Figura 8. A y B) Microfotografías de las estructuras obtenidas en el sistema de contradifusión en el gel de silicato sin el uso de aminoácidos C y D) Estructuras formadas en presencia de una proteína que no participa en el proceso de biomineralización (BSA).²²

Fase 3. Cirugía de defectos óseos en calvaria de rata y colocación del implante

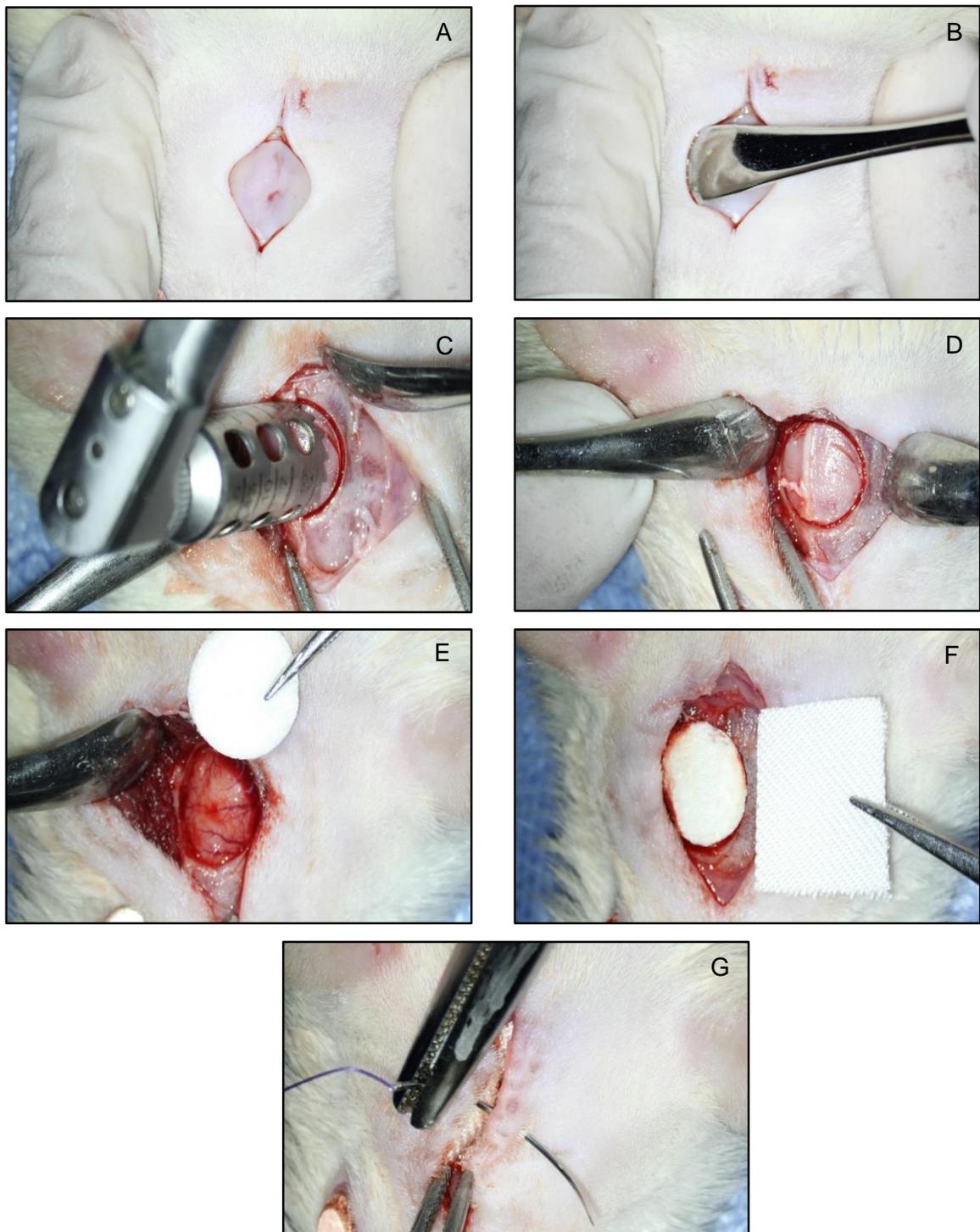


Figura 9. A) Incisión lineal de 3 cm sobre el cuero cabelludo, B) Retracción de tejidos blandos/periostio que prevenga lesiones durante la trefinación de la calvaria, C) Creación del defecto óseo crítico por medio de una trefina de 9 mm de diámetro, D) Clivaje del fragmento óseo, E y F) Implantación del andamio confeccionado, G) Sutura mediante puntos simples con Vycril 4-0. Fuente propia

Fase 4. Procesamiento histológico y análisis de resultados

Análisis histológico e histomorfometría

Se estudiaron cortes histológicos con diversas condiciones: andamios control (Alginato, Colágena autógena y Colágena xenogénica) y andamios experimentales (Alginato, Colágena autógena y Colágena xenogénica + Ácido glutámico, Fenilalanina y Ácido glutámico + Fenilalanina, según fuera el caso). Los defectos se analizaron a los 120 días.

A los 120 días los cortes histológicos que pertenecían a los grupos controles (Alginato, Colágena autógena y Colágena xenogénica), sólo presentaban una capa de tejido conjuntivo fibroso que unía los bordes del defecto, no se observaban reacciones inmunes o neoformaciones óseas. (Figuras 8 A, 9 A y 10 A).

El corte histológico que pertenecía al grupo experimental del Alginato + Ácido glutámico demostró la formación de una isla de tejido óseo en el centro del defecto unida a los bordes del mismo por una capa de tejido conectivo fibroso vascularizado. (Figura 8 B).

A su vez, el corte histológico de Alginato + Fenilalanina demostró una pequeña formación ósea, que se extendía del borde del defecto, aunque como tal, el defecto seguía unido por una delgada capa de tejido conjuntivo. (Figura 8 C).

En el corte histológico del Alginato + Ácido glutámico + Fenilalanina, se presentó una capa gruesa de tejido óseo que llenaba casi la totalidad el defecto. (Figura 8 D).

En el grupo experimental de Colágena autógena + Ácido glutámico se observó la formación de múltiples islas de tejido óseo en el centro del defecto unidas a los bordes del mismo por una capa gruesa de tejido conectivo fibroso vascularizado. (Figura 9 B).

El corte histológico de Colágena autógena + Fenilalanina mostró una pequeña neoformación ósea en el centro del defecto, que se encontraba unida a los bordes del defecto por una delgada capa de tejido conjuntivo fibroso. (Figura 9 C).

En el corte histológico de Colágena autógena + Ácido glutámico + Fenilalanina se presentó una pequeña formación cercana a uno de los bordes del defecto, que se encontraba unida al borde del lado contrario por delgadas pero múltiples capas de tejido conjuntivo fibroso. (Figura 9 D).

En cuanto al corte histológico de Colágena xenogénica + Ácido glutámico el resultado observado, fue la formación de múltiples islas de tejido óseo en el centro del defecto unidas a los bordes del mismo por una capa gruesa de tejido conectivo fibroso vascularizado. (Figura 10 B).

El corte histológico obtenido de Colágena xenogénica + Fenilalanina denotó la formación ósea en una única y pequeña isla en el centro del defecto y múltiples en

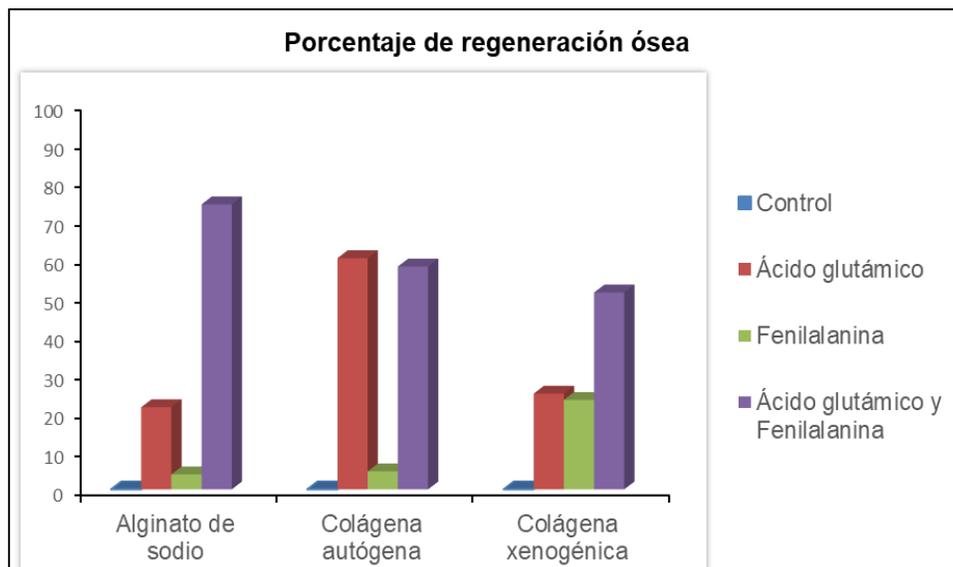
uno de los bordes del mismo, unidas todas estas islas por una gruesa capa de tejido conectivo fibroso vascularizado. (Figura 10 C).

Por último, en el corte histológico obtenido de Colágena autógena + Ácido glutámico + Fenilalanina se presentó una capa gruesa de tejido óseo que llenaba casi la totalidad el defecto. (Figura 10 D).

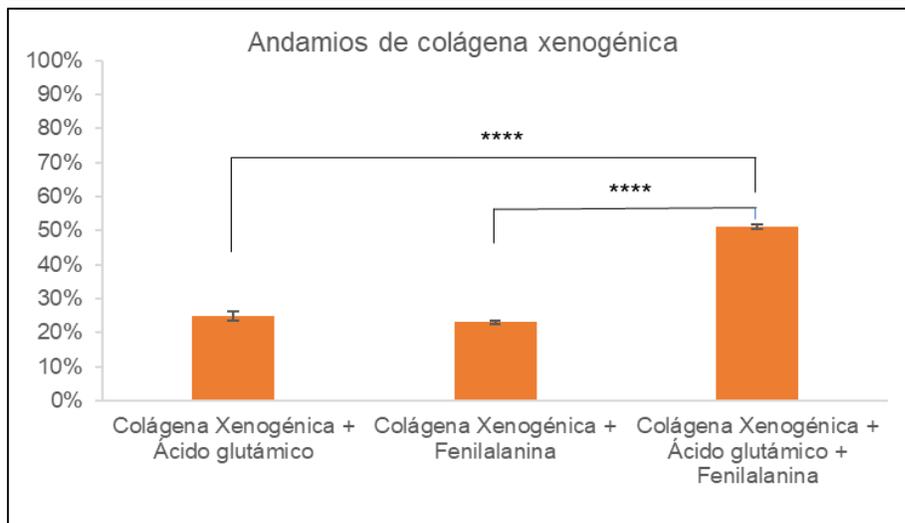
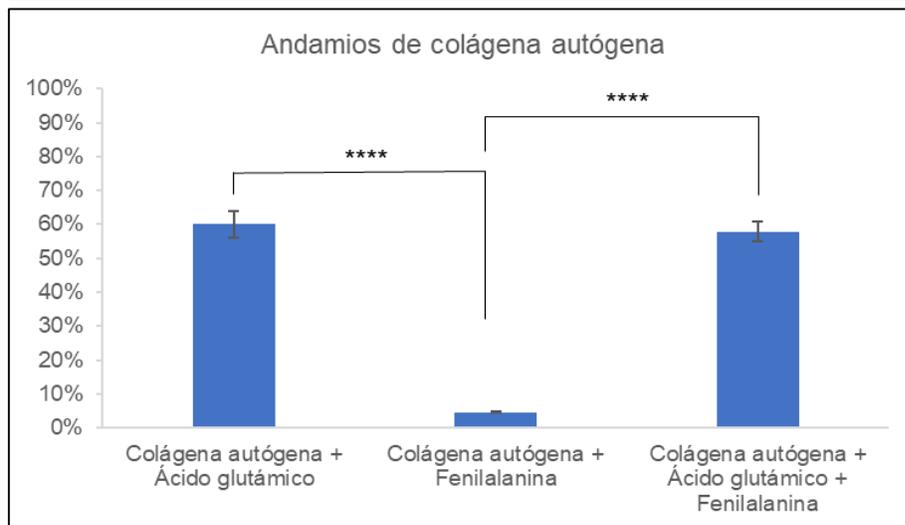
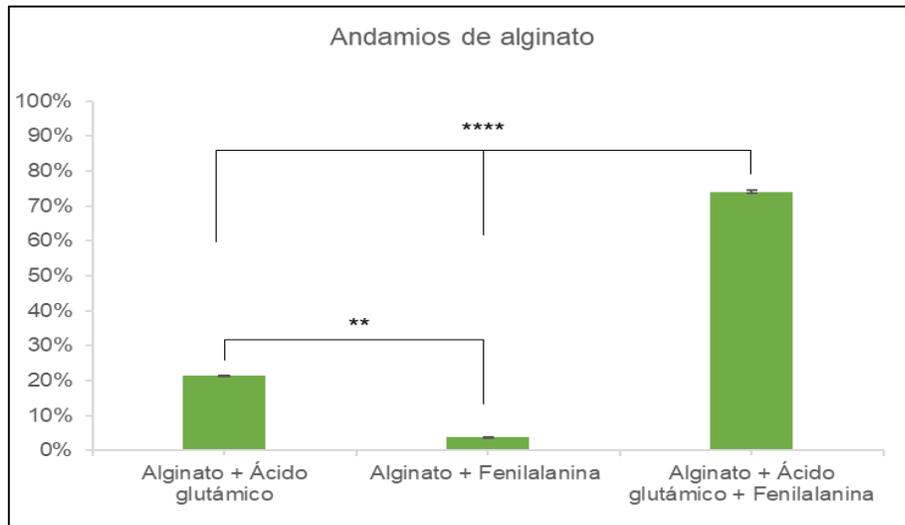
Los resultados obtenidos de la histomorfometría fueron los siguientes:

Porcentaje de relleno óseo

Aminoácido Andamio	Control	Experimentales		
		Ácido glutámico	Fenilalanina	Ácido glutámico + Fenilalanina
Alginato de sodio	0%	21.35%	3.88%	74.03%
Colágena autógena	0%	60.05%	4.67%	57.89%
Colágena xenogénica	0%	24.87%	23.13%	51.14%



Gráfica 1. Histomorfometría. Se muestra el porcentaje de neoformación ósea en los grupos controles y experimentales.



Gráficas 2, 3 y 4. Se muestra el porcentaje de neoformación de tejido óseo de los grupos experimentales, separados por andamio. De acuerdo al análisis estadístico ANOVA ($P < 0.0001$) con un post test de Bonferroni.

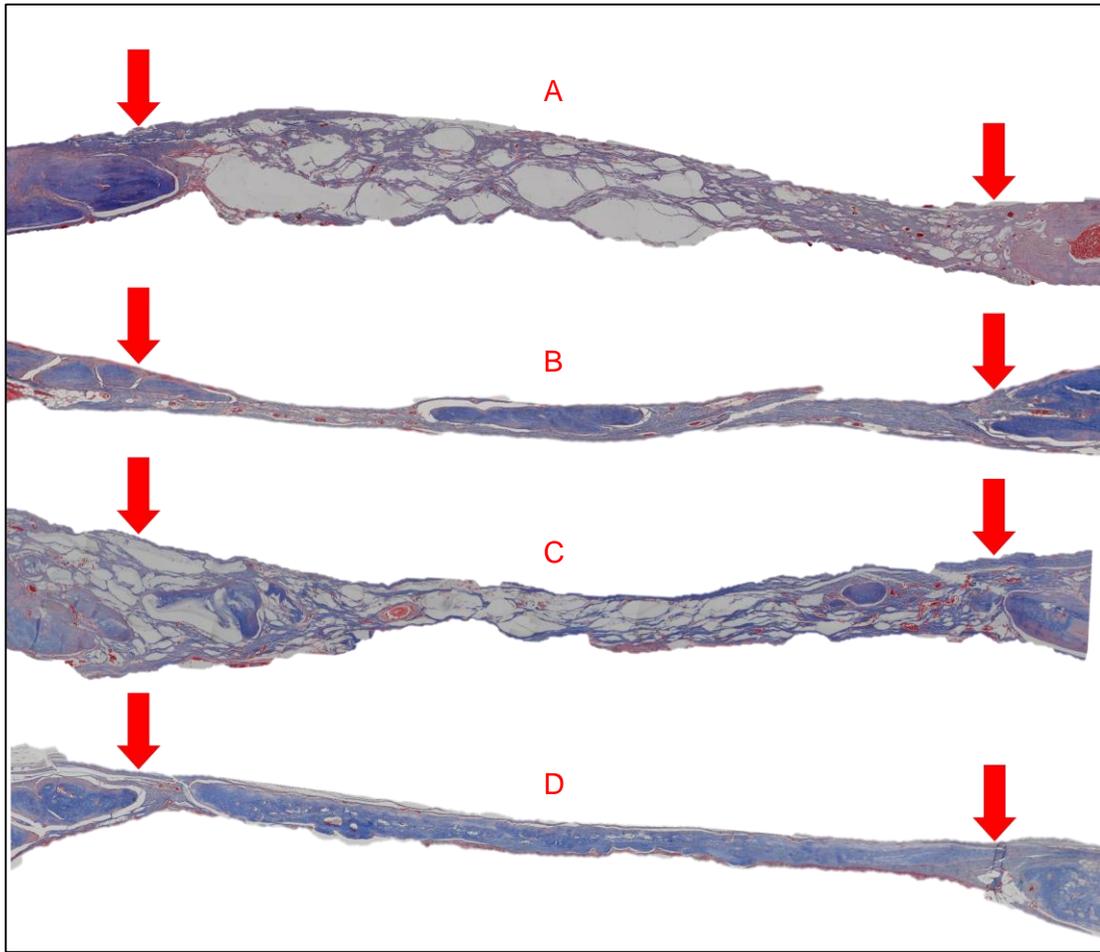


Figura 10. Reconstrucción panorámica de las calvarias de rata a 120 días.

- A) Alginato control.
- B) Alginato y Ácido glutámico.
- C) Alginato y Fenilalanina.
- D) Alginato, Ácido glutámico y Fenilalanina.

Las flechas indican los bordes del defecto. Teñidas con Tricrómica de Masson.

Fuente propia

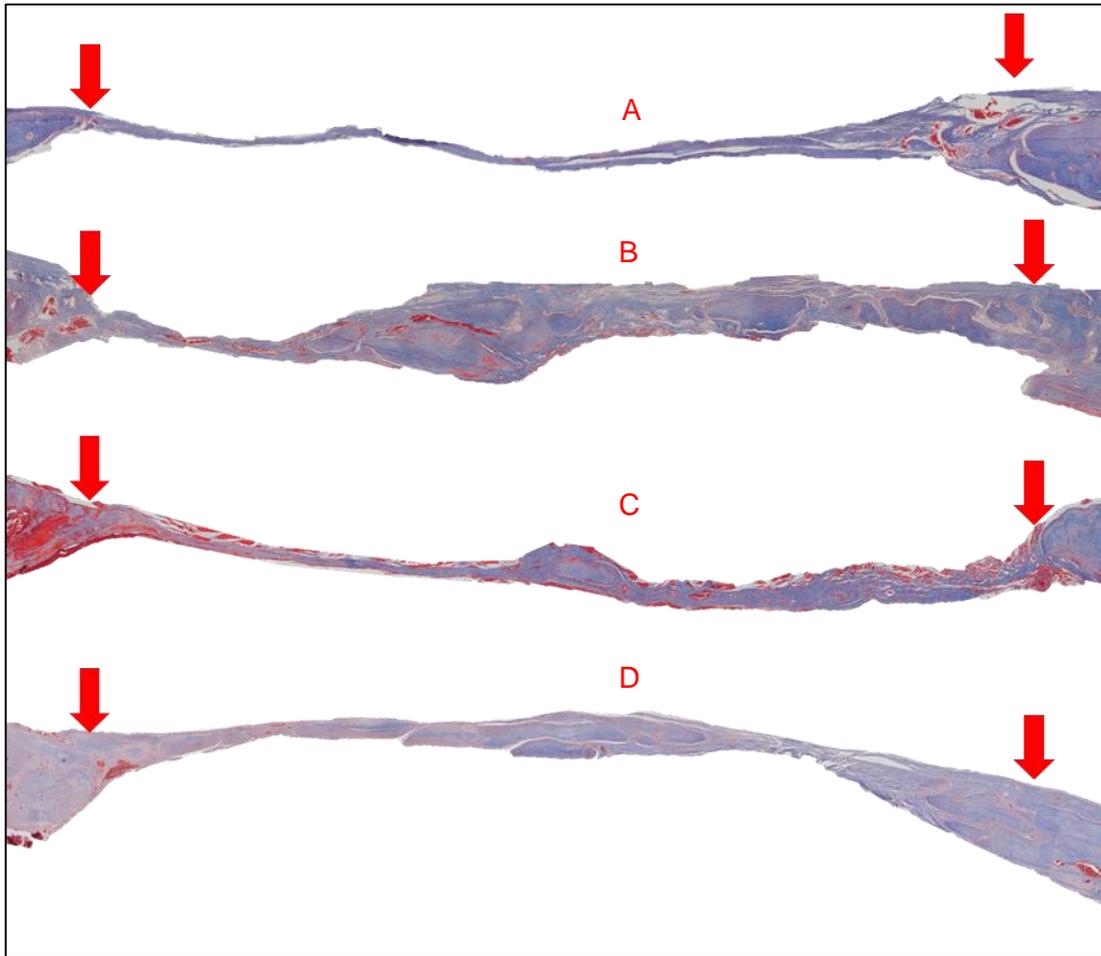


Figura 11. Reconstrucción panorámica de las calvarias de rata a 120 días.

- A) Colágena autógena control.
- B) Colágena autógena y Ácido glutámico.
- C) Colágena autógena y Fenilalanina.
- D) Colágena autógena, Ácido glutámico y Fenilalanina.

Las flechas indican los bordes del defecto. Teñidas con Tricrómica de Masson.

Fuente propia

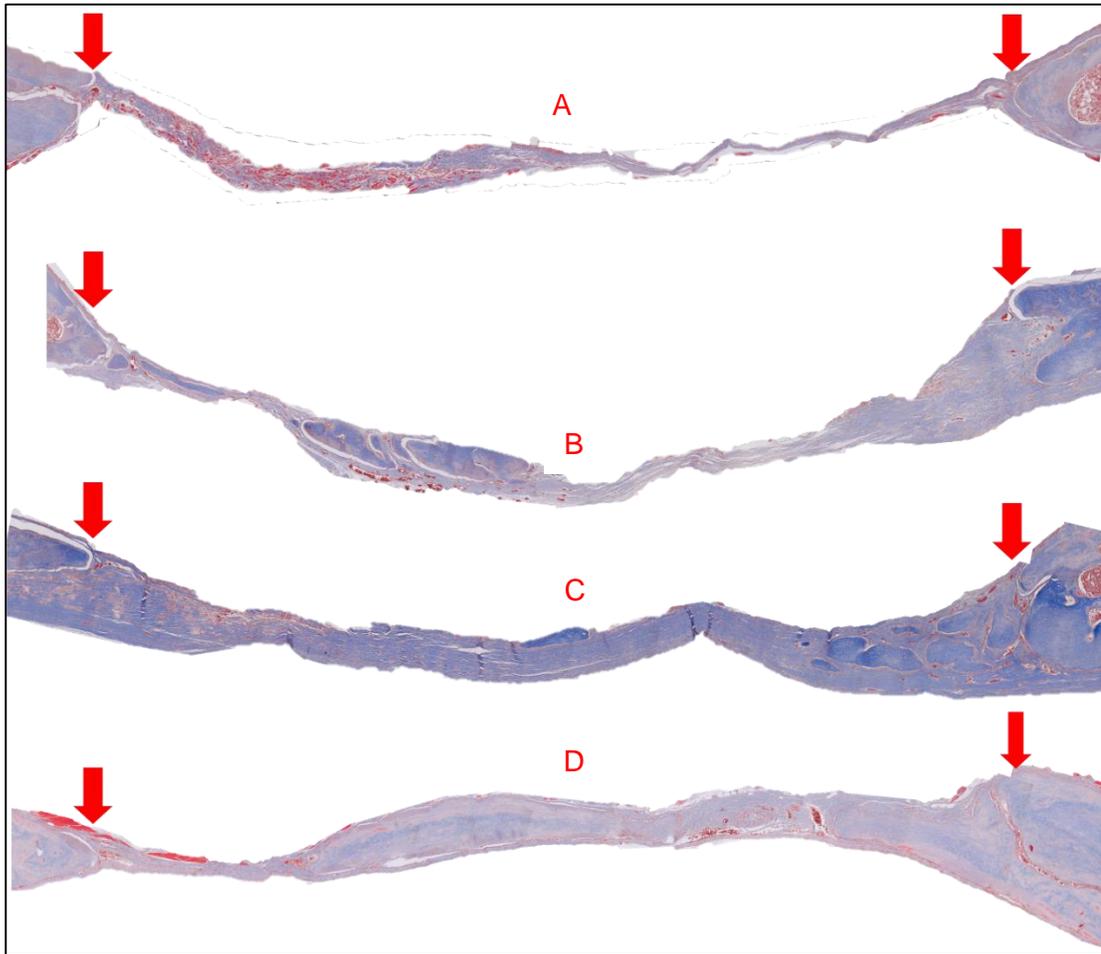


Figura 12. Reconstrucción panorámica de las calvarias de rata a 120 días.

- A) Colágena xenogénica control.
- B) Colágena xenogénica y Ácido glutámico.
- C) Colágena xenogénica y Fenilalanina.
- D) Colágena xenogénica, Ácido glutámico y Fenilalanina.

Las flechas indican los bordes del defecto. Teñidas con Tricrómica de Masson.

Fuente propia

Inmunofluorescencia

La expresión del marcador osteogénico (Sialoproteína ósea) se evaluó a los 120 días. La Sialoproteína ósea se expresó en osteocitos y osteoblastos en los grupos experimentales, no así, en el grupo control.

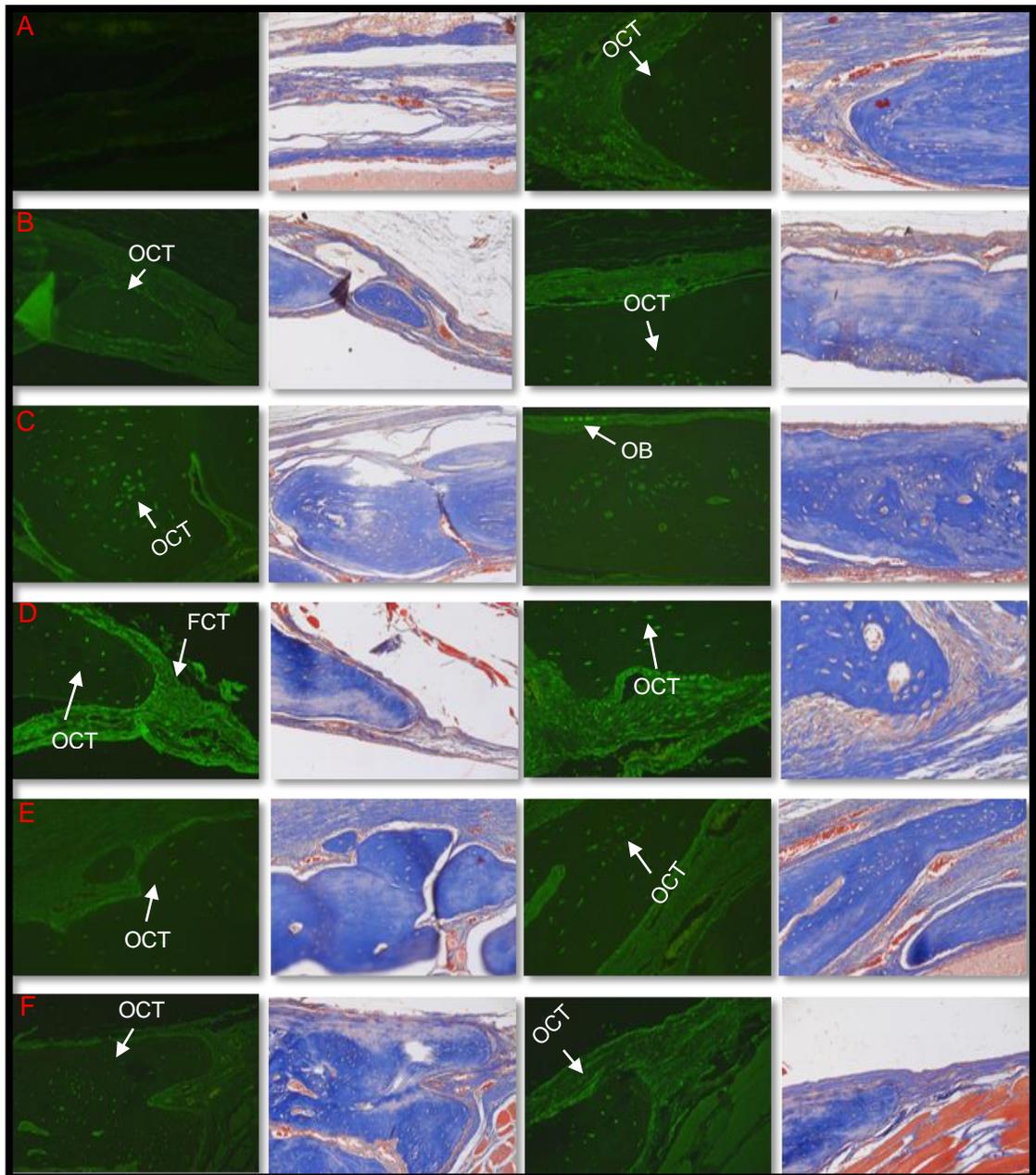


Figura 13. Imágenes representativas obtenidas por microscopio de fluorescencia.

A) Alginato de grupo control (la presencia de BSP se encuentra positiva en el hueso propio de rata), B) Alginato + Ácido glutámico, C) Alginato + Ácido glutámico + Fenilalanina, D) Colágena autógena + Ácido glutámico, E) Colágena xenogénica + Ácido glutámico, F) Colágena xenogénica + Fenilalanina.

OB (Osteoblastos), OCT (Osteocitos), FCT (Tejido conjuntivo fibroso)
Fuente propia

Discusión

La biomineralización es un proceso complejo, ya que se requiere la disposición ordenada y específica de los cristales de fosfato de calcio en una matriz ósea orgánica.^{9, 23, 24} La matriz ósea orgánica que se encuentra rodeando a las células, delimita espacialmente la disposición de los minerales, así como los sitios donde comenzará la misma.^{9, 24}

Las interrogantes acerca del complejo proceso de biomineralización han llevado al establecimiento de teorías acerca de cómo es que ocurre, y es que se sabe que las proteínas no colágenas actúan de manera activa en el proceso.^{9, 24} En este sentido, Hunter y Goldberg reportaron que el efecto de la Sialoproteína ósea (BSP) en el proceso de la mineralización está relacionado únicamente por sus regiones de aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico).²⁴

Actualmente, se sabe que sin la presencia de las proteínas no colágenas el proceso de mineralización no se lleva a cabo, ya que varias de estas moléculas actúan como iniciadores en la formación de los cristales de hidroxiapatita y en la regulación de su crecimiento. Se puede destacar a proteínas como la BSP, que actúa como un nucleador de los cristales minerales, la Osteocalcina afecta la remodelación y el reconocimiento de superficies minerales, la Osteopontina y la Osteonectina regulan el tamaño, el tipo y el crecimiento de los cristales formados.²⁴

Se han identificado que las proteínas no colágenas asociadas a la formación de cristales de fosfato de calcio, comparten características en común, estas son: a) se trata de proteínas ácidas (regiones abundantes en aminoácidos con carga negativa: ácido glutámico, ácido aspártico y fosfoserina), estas regiones tienen un efecto sobre la morfología de la hidroxiapatita, pues reconocen y dirigen el crecimiento de los cristales en un plano específico, c) están glicosiladas y fosforiladas y d) tienen afinidad por la hidroxiapatita.^{25, 26} Estudios previos han demostrado la formación de cristales de hidroxiapatita en forma de esférulas formados por múltiples cristales obtenidos en sistemas de contradifusión en gel inducidos con ácido glutámico, ácido aspártico y serina.^{26, 27} Dichos resultados son comparables con los obtenidos en este trabajo, empleando ácido glutámico, ácido aspártico y fenilalanina en el sistema de contradifusión en gel de silicato. Nuestros resultados indican que dichos aminoácidos

promueven la nucleación y crecimiento de cristales de fosfato de calcio de una manera similar a la que se obtiene usando proteínas asociadas al proceso de mineralización.

En el trabajo realizado por Jahromi MT, Yao G, Cerruti M, se menciona que la Arginina (aminoácido positivamente cargado) muestra un efecto inhibitorio sobre la precipitación de la hidroxiapatita, mientras que el Ácido glutámico presenta un efecto potente sobre la cristalización de la misma, al comparar estos aminoácidos con diferentes cargas.²⁸

Debido a que nuestros resultados de la promoción de la mineralización en el sistema de contradifusión fueron positivos, confirmando que el uso de ácido glutámico, ácido aspártico y la fenilalanina fomentan la nucleación y regulación del crecimiento de cristales de fosfato de calcio; decidimos evaluar si su uso solos o en combinación incorporados a andamios de Alginato, Colágena autógena y Colágena xenogénica tenían un efecto positivo en la regeneración ósea, en un modelo *in vivo*.

Jahromi MT, Yao G, Cerruti M.²⁸ mencionan que, si hay más de un tipo de aminoácidos en la solución, los efectos de los aminoácidos individualmente no se suman, sino que se amortiguan el uno al otro, pues forman complejos entre ellos y no con los iones presentes en la solución. Sin embargo, en el presente trabajo pudimos observar que los aminoácidos utilizados de manera aislada no tenían el mismo efecto que en sinergia, pues presentaron un mejor resultado en el porcentaje de regeneración ósea; además, que el mejor efecto lo tuvo el andamio de Alginato de sodio y la Colágena autógena, pues demostró mayor porcentaje de regeneración, sin la presencia de infiltrado inflamatorio, por lo que inferimos que son los materiales de predilección para la regeneración ósea.

Nuestros resultados en cuanto al índice de regeneración, fueron contrastados con los obtenidos en estudios previos de regeneración ósea mediante el uso de péptidos (HACD1/CAP, CEMP1-p3)²⁹, factores de crecimiento e incluso células troncales³⁰; estos muestran condiciones de regeneración similares a las obtenidas con el uso de los aminoácidos Ácido glutámico + Fenilalanina en los andamios de Alginato de sodio y Colágena autógena, presentando como ventajas significativas la accesibilidad en cuanto a su obtención, manipulación y costo.

La presente investigación se llevó a cabo como estudio piloto, para conocer la respuesta de estos aminoácidos de manera *in vitro* y posteriormente *in vivo* incorporados a andamios tridimensionales. Al tener una respuesta favorable en la mayoría de los casos, se debe pensar en la ampliación de la muestra para estudios futuros, que nos ayuden a respondernos interrogantes como: si su efecto se incrementa ante una mayor concentración de estos aminoácidos, si la combinación de aminoácidos negativamente cargados aumentará el porcentaje de regeneración y si el tiempo favorece su respuesta.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio, podemos inferir, que los aminoácidos con carga negativa desempeñan un papel importante en la biomineralización, ya que estos fueron analizados *in vitro* (sistema de contradifusión en gel de silicato) y posteriormente *in vivo* (incorporados a sistemas biológicos), teniendo resultados satisfactorios y muy similares en ambas fases a las proteínas involucradas en el proceso de biomineralización, teniendo como ventaja su accesibilidad.

Específicamente, podemos inferir, que la mezcla de los aminoácidos Ácido glutámico y Fenilalanina incorporados a andamios de Alginato y Colágena autógena constituyen una alternativa prometedora para aplicaciones clínicas futuras debido a su bajo costo, facilidad de obtención, manipulación y estabilidad; sin embargo, es importante resaltar que el andamio de Alginato de sodio presenta mayor predilección para la regeneración ósea, ya que, la sinergia de ambos aminoácidos tuvo mejores resultados en este material tridimensional.

Perspectivas

A pesar de haber obtenido resultados significativos del papel que desempeñan los aminoácidos *in vitro* interactuando con los iones presentes en el sistema de contradifusión en el gel de silicato, es de importancia someter a un sistema *in vivo* dichas biomoléculas, para lograr una comprensión más profunda de la interacción que los aminoácidos tienen en un sistema biológico en condiciones similares a las fisiológicas, en donde existen factores que podrían influir en la precipitación de la hidroxiapatita.

Por lo tanto, la prueba *in vitro* propuesta es un cultivo celular al cual se le adicionen aminoácidos (Ácido glutámico y Fenilalanina) solos y en combinación para evaluar la expresión de marcadores asociados al proceso de mineralización.

Otro punto importante a considerar, es que, como se ha mencionado anteriormente, los aminoácidos positivamente cargados como la Arginina, tienen un efecto inhibitorio en la precipitación de la hidroxiapatita y los aminoácidos negativamente cargados como el Ácido glutámico presentan un efecto potente sobre la cristalización de la HA, por lo que sientan las bases para ser aprovechadas estas características en el tratamiento de enfermedades patológicas causadas por una mineralización excesiva en tejidos blandos y en la terapia ósea regenerativa, respectivamente.

Referencias

1. Ross, Michael H (2012). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular* / Michael H. Ross y Wojciech Pawlina, 6a ed., Buenos Aires: Médica Panamericana.
2. Tortora, G, J, Derrickson (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. 11ª ed., México: Médica Panamericana.
3. Marx Robert (2007) Bone and Bone Graft Healing. *Oral Max Surg Clin N Am* 19. 455-466.
4. Jayachandran V., R.Nithya, Prasad N.Sudha, Se-KwonKim (2014). Role of Alginate in Bone Tissue Engineering. *Advances in Food and Nutrition Research* Volume 73, Pages 45-57. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00004-4>
5. Shun-ichi Harada & Gideon A. Rodan (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* | vol 423. Disponible en: doi: 10.1038/nature01660
6. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11:E47-51.
7. Clarke, Bart (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 3(Suppl 3): S131–S139.
8. Anders Lindahl, Richard O.C. Oreffo (2015). *Tissue Engineering*, 2a ed., Academic Press.
9. Tavafoghi M, Cerruti M. (2016). The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *J. R. Soc. Interface* 13:20160462. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2016.0462>
10. Uniprot. org
11. Estrada, Catalina, Paz, Ana Cristina, & López, Luis Ernesto. (2006). Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Revista EIA*, (5), 93-100.
12. Sumrita Bhat and Ashok Kumar (2013). Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*. 3(3): e24717. Disponible en: doi: 10.4161/biom.24717

13. Parikh S N (2002). Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med*;48:142
14. Sheng Yi, Fei Ding, Leiei Gong and Xiaosong Gu (2017). Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine *Current Stem Cell Research & Therapy*. Volume 12, Issue 3. Disponible en: DOI : 10.2174/1574888X11666160905092513
15. Young Lee (2012). Alginate properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. Jan; 37(1): 106–126. Disponible en: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
16. Sun J. (2013). Alginate based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials (Basel)*; 6(4):1285-1309. doi: 10.3390/ma6041285.
17. Dong, C., Yonggang, L. (2016). Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*, vol. 8, ed. 2, pp. 42.
18. Hulmes D. (2008) Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In: Fratzl P. (eds.) *Collagen*. Springer, Boston, MA.
19. Jiménez Santos, Alexis. Extracción de colágena tipo 1 de cola de rata, procesamiento, almacenamiento y formación de andamios de colágena.
20. Patrick P.Spicer (2012). Evaluation of Bone Regeneration Using the Rat Critical Size Calvarial Defect. *Nat Protoc*.7(10): 1918–1929. doi:10.1038/nprot.2012.113.
21. Romo- Arévalo, E. (2014) Caracterización estructural de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y su relación con la función biológica. México: UNAM.
22. Romo-Arévalo (2016), E. High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. *FEBS Letters* 590 129–138.
23. L.T. Kuhn (2001), Bone Mineralization. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*.
24. J. Jansen (2016). Mineralization processes in hard tissue in *Biomaterialization and Biomaterials*.
25. Eiden-ABmann S, Viertelhaus M, HeiB A, Hoetzer K, Felsche J. (2002).The influence of amino acids on the mineralization of hydroxyapatite in gelatin. *J Inor Biochem*; 91: 481-486

26. Romo-Arévalo, E. (2010). Papel inductor de la proteína del cemento 1 recombinante humana (hrCEMP1) en el proceso de mineralization in vitro. México: UNAM.
27. Tartaix P, Doulaverakis M, George A, *et. al.* (2002). In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *J Biol Chem*, 279; 18115-18120
28. Jahromi MT, Yao G, Cerruti, M. (2013) The importance of amino acid interactions in the crystallization of hydroxyapatite. *J R Soc Interface* 10: 20120906.
29. Salgado-Chavarría, F (2014). Inducción de la regeneración ósea en defectos óseos severos por el efecto del péptido novel derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP). México: UNAM.
30. López-Leytaf, Sonia (2017). Células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal: su potencial en la regeneración ósea in vivo. México:UNAM.