



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO DE  
GELATINA-ÁCIDO HIALURÓNICO CON  
MICROESFERAS DE QUITOSÁN PARA  
REGENERACIÓN ÓSEA

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:

Mónica Ayrem Nava Chávez

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Katia Jarquín Yáñez

Cd.Mx. Mayo

2022





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.

## DEDICATORIA

*Con todo mi corazón y amor para  
Mis padres, Gerardo Nava Palma y Mónica Chávez Muñoz.*

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS:

Al Doctor Castell Rodríguez Andrés E., por permitirme ser parte del laboratorio donde tuve un gran crecimiento académico, y por todo el apoyo para realizar este proyecto.

A mi tutora, la Doctora Jarquín Yáñez ya que durante estos años se ha dedicado a ensañarme a trabajar en la parte técnica, expandirme sus conocimientos y el amor a la investigación.

Agradezco a todas las personas involucradas para el desarrollo de esta tesis:

Al equipo de trabajo del Instituto de Física por el apoyo en técnicas de microscopía:

- Aguilar Franco Manuel
- Tehuacanero Cuapa Samuel
- Hernández Reyes Roberto
- Quiterio Vargas Diego

Al Doctor Álvarez Gayosso Carlos, del laboratorio de materiales en el posgrado de Odontología, por haber estado presente en todo el desarrollo del proyecto y ser como un segundo tutor.

A los integrantes del laboratorio de inmunoterapia experimental e ingeniería de tejidos, por ayudar en diferentes técnicas y ensayos:

- Benítez Barrera Diego Iván
- Bucio Vegas Beatriz
- Carranza Jiménez Zoé Pamela
- Biol. Hernández Téllez Beatriz
- Dr. Herrera Enríquez Miguel
- Dra. Piñón Zárate Gabriela

Y por último a Alquicira Guerrero Raquel

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

A todas las personas que estuvieron involucradas, las quiero y agradezco desde el fondo de mi corazón, son muy especiales.

A mis padres Gerardo Nava Palma y Mónica Chávez Muñoz, por ser los mejores padres, gracias por todo el apoyo, por todos los sacrificios que han hecho para darme todas las herramientas para cada etapa de mi vida, por ser mis guías, mis mejores amigos, por llenarme de confianza para realizar cualquier cosa que me proponga. Ustedes han creído en mí con los ojos cerrados y son mi mayor inspiración y motivación para seguir con mis sueños, los amo.

A mis hermanitos: Sofía Nava y Gerardo Nava, por hacer mi vida más feliz cada día, apoyarme siempre, espero ser un ejemplo para los dos y que logren todo lo que se propongan solos o con mi apoyo, son todo para mí.

A mis abuelos Ignacio Nava y Rosa Palma, Anastasio Chávez y María Muñoz por ser unos segundos padres, creer siempre en mí y llenarme de amor.

A mi tío Wistano Chávez Muñoz, por no dejarme sola, apoyarme en cada paso que daba y hasta el último momento estar orgulloso de mi, siempre estás en mí, eres un ángel y sé que estarás feliz por este paso. A mi tío Miguel Chávez, por siempre estar al pendiente, cuidarme y quererme.

A amigos de la Facultad de ciencias, en especial, para Cesar, Edgar, Alfredo, Gustavo, Pablo, Francisco, Alanis y Shannen, los llevo siempre en el corazón.

A los miembros del laboratorio de inmunoterapia experimental e ingeniería de tejidos, a la Biól. Beatriz Hernández, por el tiempo de apoyo, y por ayudar a mi formación académica y personal, a mis amigas y colegas, Alda, Mony, Karent, Gabriela Cano, las cuatro son grandes mujeres dedicadas a la ciencia, son motivación e inspiración, las quiero.

A mis amigos de toda la vida: Raúl, Diego, Alex, Francisco y Eduardo C., por la gran amistad y el cariño que me han brindando, se aventaron todo el proceso de titulación, gracias.

A mis eternas y mejores amigas Valeria Ríos y Greta Vidahí, por el apoyo moral, cada risa y cada lágrima que hubo en este proceso y por tanto amor en estos 10 años, las amo.

A la Dra. Katia Jarquín Yáñez que me brindó todos sus conocimientos, tiempo y apoyo, más que una tutora, un pilar de apoyo y amistad, nunca voy a dejar de estar agradecida por el carácter y la formación que me ha sembrado en mí, y sobre todo, por confiar ciegamente y diario motivarme a dar lo mejor de mí.

Al Dr. Castell, por ser una extraordinaria persona, llenarme de apoyo y cariño desde el primer día en el laboratorio, confiar en mi trabajo y conocimientos, y lo más importante, siempre sacarme una sonrisa.

Por último a Abraham Rodríguez, por volverse parte fundamental de mi vida, apoyarme a cumplir cada uno de mis sueños, por escucharme tantas veces hablar de mis experimentos y aguantar el estrés que tuve en este proceso, agradezco profundamente la paciencia, el estar a mi lado y tantas muestras de amor, te amo.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES .....	15
2.1 Tejido óseo.....	15
2.1.1 Células.....	15
2.1.2 Formación del tejido óseo.....	19
2.1.3 Factores de Mineralización .....	22
2.1.4 Propiedades Mecánicas del hueso .....	25
2.1.5 Reparación de fracturas.....	27
2.2 Ingeniería de tejidos.....	28
2.2.1 Pilares .....	29
2.2.2 Biomateriales en tejido óseo.....	35
2.3 Microesferas .....	39
2.3.1. Elaboración de las microesferas.....	39
2.3.2 Degradación de microesferas.....	40
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	42
4. HIPÓTESIS.....	43
5. OBJETIVOS.....	44
6. MÉTODO.....	45
7. RESULTADOS .....	54
7.1 Microesferas de Quitosán.....	54
7.2 Andamios de Gelatina-Ácido Hialurónico con microesferas de Quitosán.....	55
7.3 Prueba de tensión .....	57
7.4 Prueba de compresión.....	59
7.5 Degradación <i>in vitro</i> .....	62
7.6 Diámetro y profundidad del poro .....	66
7.7 Degradación <i>In vivo</i> .....	70
7.8 Evaluación del fenotipo de células troncales a través de citometría de flujo .....	72
7.9 Ensayo de citotoxicidad .....	73
7.10 Presencia de células estromales de Médula ósea de Rata en el andamio de Ge-HA con microesferas de Quitosán.....	75
8. CONCLUSIONES.....	76
9. PERSPECTIVAS.....	78
10. APÉNDICE A.....	79



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Tríada de ingeniería de tejidos

FIGURA 2. Figura Ilustrativa de la prueba de degradación in vitro de andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán entrecruzado a diferentes concentraciones de EDC.

FIGURA 3. Figura Ilustrativa de la prueba de degradación in vivo de andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán entrecruzado con 50mM de EDC.

FIGURA 4. Figura Ilustrativa de la prueba de citotoxicidad

FIGURA 5. Microesferas de quitosán

FIGURA 6. Andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán.

FIGURA 7. Prueba de tensión en andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a diferentes concentraciones de EDC

FIGURA 8. Módulo elástico de andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a diferentes concentraciones de EDC

FIGURA 9. Prueba de compresión en andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a diferentes concentraciones de EDC

FIGURA 10 Módulo elástico (compresión) de andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a diferentes concentraciones de EDC

FIGURA 11. Degradación in vitro del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a 14 días.

FIGURA 12. Degradación in vitro del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a 22 días.

FIGURA 13. Degradación in vitro del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con colagenasa tipo I

FIGURA 14. Andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán

FIGURA 15. Tomografía OCT del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán.

FIGURA 16. Diámetro de los poros del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán

FIGURA 17. Gráfica del diámetro del poro de andamios de gelatina- ácido hialurónico con microesferas de quitosán.

FIGURA 18. Degradación in vivo del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán

FIGURA 19. Citometría de flujo del fenotipo de las células troncales de médula ósea de rata.

FIGURA 20. Citotoxicidad del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a 24 horas y 4 días

FIGURA 21. Presencia de células estromales en los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán

FIGURA 22. Esfuerzo máximo a la compresión de los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con diferentes concentraciones de EDC con el área efectivo

FIGURA 23. Gráfica del esfuerzo máximo a la elongación de los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con diferentes concentraciones de EDC.

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Proteínas en la matriz extracelular ósea

TABLA 2. Valores del tejido óseo en pruebas mecánicas.

TABLA 3. Factores de crecimiento relacionados con el tejido óseo

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La ingeniería de tejidos (IT) busca restaurar, sustituir o incrementar actividades funcionales de tejidos que se encuentran dañados. La IT en tejido óseo emplea andamios compuestos de materiales de origen natural como la gelatina (Ge), elementos de la matriz extracelular como ácido hialurónico (AH), además de células troncales, que pueden ser estimuladas a través de factores de crecimiento en el andamio, existen diversas técnicas para la liberación de dichos factores, una de ellas es encapsular en microesferas, los cuales se liberan paulatinamente y podrían inducir la diferenciación y proliferación de estas células. Logrando así, un injerto óseo que podría ser empleado en defectos óseo como relleno, estimulando la producción de nueva matriz extracelular.

**OBJETIVO:** Construir y caracterizar física, mecánica y biológicamente un andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán para regeneración ósea.

**MÉTODO:** Se preparó una solución de gelatina-ácido hialurónico en una proporción 4:1 respectivamente, a la cual se le agregaron las microesferas de quitosán al 2% obtenidas por el método de emulsión simple, se liofilizó y se entrecruzó con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) a 4 concentraciones molar: 6, 30, 50 y 60mM., posterior a ello, se evaluó la morfología de los andamios a través de microscopía electrónica de barrido, la tensión y compresión de cada andamio con una máquina Instron, así como la tasa de degradación *in vitro* e *in vivo*. Por otro lado, a través del método de perfusión se obtuvieron células troncales de médula ósea de rata Wistar, las cuales fueron teñidas con los anticuerpos CD90, CD44, STRO-1 y Fosfatasa Alcalina para ser analizadas en el citómetro de flujo FacsCalibur, finalmente éstas células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  células sobre los andamios de Ge-AH con microesferas de quitosán, se evaluó la citotoxicidad a través del kit live/died, se fijaron las muestras con formol al 10% y se procesaron por técnica histológica convencional tiñéndolas con H&E.

**RESULTADOS:** En promedio, el tamaño de las microesferas de quitosán fueron menores a un micrómetro y de morfología redondeada, el tamaño del poro de los andamios fue de 300 a 500 micras, en la prueba de compresión, los andamios Ge-AH con microesferas de quitosán entrecruzados con la concentración de 60mM de EDC fueron los que mostraron un menor grado de deformación, mientras que los resultados en la prueba de tensión, la mayor elasticidad se encontró en los andamios entrecruzados con 30mM. La tasa de degradación *in vitro* de los andamios fue variable respecto a la concentración, la concentración de 6mM tuvo un menor tiempo de degradación en comparación con 60mM. Con respecto a la degradación *in vivo* del andamio Ge-AH con microesferas de quitosán entrecruzado con 50mM de EDC, se observó que comenzó a degradarse a los 7 días posteriores a su implantación y para el día 30 fueron poco perceptibles los residuos del andamio. Las células de médula ósea de rata fueron positivas en menor porcentaje a STRO1, y en mayor porcentaje a CD90 y CD44, dando como resultado que solo del 1 al 0.1% de las células de medula ósea son células troncales. Finalmente se observó que los andamios de Ge-AH con microesferas de quitosán entrecruzado con 50mM fueron biocompatibles, siendo las células estromales de médula ósea sembradas sobre ellos positivas al reactivo de calceína a las 24 y 4 días.

**CONCLUSIONES:** El andamio de Ge-AH con microesferas de quitosán entrecruzado con 50mM de EDC ofreció un menor grado de deformación y mayor elasticidad, además demostró ser un andamio biocompatible y biodegradable que permitió el crecimiento celular y la diferenciación, por lo que podría ser una buena alternativa para para la reparación de defectos óseos.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Tissue engineering (TE) look for restoring, replacing or increasing functional activities of the tissues, which have been affected by any damage. TE in bone tissue has used materials of natural origin such as gelatin (Ge) and other elements of the extracellular matrix as hyaluronic acid (HA) for the construction of scaffolds, in addition, TE uses stem cells too, they can be stimulated with growth factors encapsulated into chitosan microspheres, which are released gradually and it could induce the differentiation and proliferation of these cells. The purpose is achieving a bone graft, which could be used in bone defects as filler; also it could stimulate the production of new matrix.

**OBJECTIVE:** To construction and physical, mechanical and biological characterization of scaffold of gelatin and hyaluronic acid with microspheres of chitosan to bone regeneration

**METHOD:** A gelatin- hyaluronic acid solution was prepared in 4:1 ratio respectively to the quality the 2% of chitosan microspheres obtained by the simple emulsion method were added, lyophilized and cross-linked with 6, 30, 50,60mM and after this, the scaffold morphology was evaluated through scanning electron microscopy, the tension and compression of each scaffold with an Instron machine, as well as the degradation rate in vitro and in vivo. On the other hand, through the perfusion method, Wistar rat bone marrow stem cells were obtained, which were stained with the antibodies CD90, CD44, STRO-1, and Alkaline Phosphatase to be analyzed in the Facscalibur Flow cytometer, finally the cells were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells on Ge-AH scaffolds with chitosan microspheres, cytotoxicity was assessed through the live/dead kit, samples were fixed with 10% to formol and processed by histological technique conventional staining with H&E

**RESULTS:** On average, the size of the chitosan microspheres were less than one micrometer and the rounded morphology, with respect to the pore size of the scaffolds, was 300-500 micrometers, in the compression test, the Ge-AH scaffolds with chitosan microspheres crosslinked with the concentration of 60mM EDC showed the least degree of the deformation, while the results in the stress test, the highest elasticity was in the scaffolds crosslinked with 30mM. The results on the *in vitro* degradation rate of the scaffolding found that the 6mM concentration had a shorter degradation time compared to 60mM, which was the concentration that took the longest to degrade.

Regarding the *in vivo* degradation of the Ge-AH scaffold with chitosan microspheres cross-linked with 50mM EDC, it was observed that it began to degrade 7 days after its implantation and by day 30 the scaffold residues were barely noticeable. Rat bone marrow cells were STRO1 less positive, and CD90 and CD44 higher, resulting in only 1 to 0.1% of bone marrow cells being stem cells. Finally, it was observed that the Ge-AH scaffolds with 50 mM cross-linked chitosan microspheres were biocompatible, with the bone marrow stem cells seeded on them positive for the calcein test reagent at 24 and 49hours.

**CONCLUSIONS:** The Ge-AH scaffold with chitosan microspheres crosslinked with 50mM EDC offered a lesser degree of deformation and greater elasticity, as well as being a biocompatible and biodegradable scaffold that allows cell growth and differentiation, so it could be a good alternative for bone tissue engineering for the repair of bone defects

## 1. INTRODUCCIÓN

La Ingeniería de Tejidos (IT) para aplicación ósea ha sido una gran herramienta empleada para la reparación de defectos causados por traumas, enfermedades o por degeneración, entre otras. A lo largo del tiempo se han utilizado materiales similares para la creación de diferentes andamios para regeneración ósea, por ejemplo, Singh., *et al* en 2014, realizaron un andamio de gelatina-ácido hialurónico y alginato, con el objetivo de que fuera biocompatible y biodegradable con una arquitectura porosa interconectada, realizando una evaluación *in vitro* del crecimiento de células madres humanas derivadas de médula ósea, que mostraron un incremento en la actividad de enzima fosfatasa alcalina y la evaluación de la integración del andamio con el tejido huésped (*In vivo*).

Dentro de los trabajos realizados en el laboratorio de Inmunoterapia Experimental e Ingeniería de Tejidos en el 2016, Arellano Olivares realizó la estandarización de las concentraciones de Gelatina-ácido hialurónico (Ge-HA) para la creación de un andamio dérmico añadiendo una cubierta de PDMS, en el mismo año, Jarquín Yáñez, empleó este andamio de gelatina-ácido hialurónico para aplicación ósea y se estandarizó la síntesis de microesferas de Quitosán cargadas con proteínas morfogenéticas óseas tipo 2 (BMP-2) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), por lo que el presente trabajo da continuidad a esa línea de investigación, en el cual, se logró ahora incorporar al andamio de Gelatina-Ácido Hialurónico las microesferas de Quitosán, además de complementar las pruebas de caracterización física, mecánica y biológica del andamio con las microesferas, esto con la finalidad de obtener un andamio de Ge-HA con microesferas de quitosán que pueda ser usado en defectos óseo.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Tejido óseo**

El tejido óseo es un sistema dinámico capaz de repararse, y de adaptar sus características estructurales, su masa y sus propiedades intrínsecas a su entorno, tanto bioquímico como mecánico. Cuenta con diferentes funciones: la primera función del tejido óseo es mecánica, es decir, dar sostén y soporte estructural al cuerpo, protección del organismo a través de la caja craneana, columna vertebral, caja torácica, protegiendo a su vez órganos nobles, así como de punto de inserción de los tendones y los ligamentos; la segunda función de los huesos es metabólica, constituyen el reservorio de calcio del organismo. El tejido óseo está en remodelación constante, dependiendo de su ambiente o de las lesiones que sufre; la tercera función de este tejido es el alojamiento de la médula ósea, que contiene células madre que son capaces de diferenciarse a células de diferentes linajes (Sepúlveda, 2013; Chaband, 2018).

El tejido óseo desde el punto de vista histológico es considerado como un tejido conjuntivo especializado compuesto por células y su matriz extracelular, donde la principal característica es que su matriz se encuentra calcificada, esta sustancia intercelular tiene la característica de estar osificada lo que otorga al hueso, la rigidez y la resistencia tanto a la tracción como la compresión (Sepúlveda, 2013; Brusco, et al. 2014).

#### **2.1.1 Células**

El tejido óseo se conforma de diferentes células entre las cuales se encuentran las células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo y osteoclastos.



#### 2.1.1.1 Osteoprogenitoras

Células osteoprogenitoras, son células indiferenciadas que derivan de células madre mesenquimales de médula ósea embrionaria, se ubican en la superficie interna y externa de los huesos, es decir, el periostio y endostio, estas células pueden recibir al sistema micro vascular que irriga el tejido óseo (Ross & Pawlina, 2008).

La morfología de las células osteoprogenitoras muestran un núcleo de forma oval con cromatina laxa, citoplasma escaso y de color pálido, escaso retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi (Brusco, et al., 2014).

Durante la formación del tejido, las células indiferenciadas formarán los osteoblastos que serán los encargados de la secreción de matriz ósea, estas, darán origen a los osteocitos. Por otro lado, los osteoclastos resultan de otro origen perteneciente a la línea hematopoyética. La diferenciación de las células osteoprogenitoras requiere del factor de transcripción llamado factor fijador central alfa-1 o factor de transcripción dos relacionado con RUNX2 (Brusco, et al., 2014; Ross & Pawlina, 2008).

#### 2.1.1.2 Osteoblastos

Los osteoblastos derivan de células mesenquimatosas pluripotenciales, tienen la capacidad de diferenciarse en osteocitos, células de revestimiento óseo (10 al 20% de los osteoblastos pueden diferenciarse) (Gutiérrez, 2008). su función principal es la producción de la matriz ósea, que empieza con la secreción de colágeno tipo I y la sustancia fundamental que construye la matriz no mineralizada que recibe el nombre de osteoide, en esta matriz no calcificada se alojan a los osteoblastos (Brusco, et al., 2014). Durante el período en que la célula produce la matriz ósea, el osteoblasto tiene a cargo el proceso de la calcificación de la misma, el cual se lleva a cabo mediante la secreción de pequeñas vesículas matriciales 50 a 250 nm de diámetro, que contienen iones de calcio, fosfato, fosfatasa alcalina en grandes cantidades y piro fosfatasa. (Ross & Pawlina, 2008; Gutiérrez, 2008).

Cuando un osteoblasto queda totalmente rodeado por el osteoide, la célula cambia su nombre a osteocito, este cambio ocurre en tres días aproximadamente, durante este tiempo, la célula produce una gran cantidad de matriz extracelular y reduce el volumen celular en un 70% (Ross & Pawlina, 2008; Fortoul, 2017). Los osteoblastos responden a estímulos mecánicos, para medir los cambios en el crecimiento óseo y el remodelado de los huesos.

Los osteoblastos tienen una morfología cúbica o cilíndrica, un núcleo de gran tamaño y redondeado, excéntrico ubicado en el polo opuesto a la zona de liberación de la sustancia osteoide, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático rugoso (RER) están bien desarrollados y es posible observarlos en tinción histológica las mitocondrias son abundantes, los osteoblastos se encuentran localizados en el endostio (Sepúlveda, 2013).

#### 2.1.1.3 Osteocito

Los osteocitos constituyen las células óseas maduras del tejido óseo y son responsables del mantenimiento, síntesis y reabsorción de la matriz ósea. Estas células tienen tres estados funcionales:

- osteocito latente: se encuentran rodeados de la matriz calcificada
- osteocito formativo: se encuentran en constante cambio de la matriz circundante
- osteocitos resorptivo: son células situadas o inmersas en el interior de la matriz ósea, que son estimuladas por el incremento de la secreción de la hormona paratiroidea o paratohormona (PTH) (Brusco, et al., 2014).

Esta población celular se encuentra en espacios dentro de la matriz ya mineralizada, denominadas lagunas osteocíticas, que emiten múltiples prolongaciones con otros osteocitos vecinos y células de revestimiento óseo, a través de las uniones de hendidura, que se alojan en canales llamados canalículos, estos hacen posible establecer uniones de intersticios y se difunden los nutrientes necesarios para las células (Sepúlveda, 2013).

Los osteocitos tienen un soma de forma aplanado con un núcleo pequeño y de cromatina densa, rodeada por matriz que secretaron anteriormente los osteoblastos, el RER y el aparato de Golgi esta poco desarrollado y presentan gránulos (Fortoul, 2017).

#### 2.1.1.4 Osteoclastos

Los osteoclastos son células de gran tamaño o gigante, son multinucleadas (6 a 50 núcleos) y (Brusco, et al., 2014; Ross and Pawlina, 2008). Son derivados de la línea hematopoyética monocito-macrófago, son las células encargadas de la homeostasis ósea, síntesis y resorción ósea a través de la secreción de colagenasas y otras enzimas, poseen receptores para diversos factores como factor estimulante del osteoclasto osteoprotegerina y calcitonina (Mikán & Oliveros, 2007; Gutiérrez, 2008; Sepúlveda, 2013). Se localizan sobre depresiones superficiales de la matriz ósea llamadas lagunas de resorción o laguna de Howship (Ross & Pawlina, 2008).

Los osteoclastos presentan distintas zonas en su estructura:

- El borde festoneado: Es la porción de la célula que está en contacto directo con el hueso.
- La zona clara o de sellado: es un compartimiento a la altura del borde festoneado, donde se produce la resolución y la degradación de la matriz. Contiene micro filamentos de actina que están dispuestos en una estructura en forma de anillo, rodeada por ambos lados de proteínas fijadoras de actina. La membrana plasmática a la altura de esta zona contiene moléculas de adhesión célula matriz extracelular y son responsables de un sello hermético entre la membrana celular y la matriz ósea mineralizada.
- La región baso lateral: interviene en la exocitosis del material digerido, las vesículas de transporte contienen material óseo endocitado y degradado a la altura del borde festoneado, se fusionan y aquí donde la membrana celular libera su contenido (Ross & Pawlina, 2008; Fortoul, 2017).

## 2.1.2 Formación del tejido óseo

### 2.1.2.1 Osificación

El tejido óseo se forma a partir del tejido cartilaginoso o del tejido mesenquimatoso. El proceso se denomina osificación intramembranosa y da origen a los huesos planos, la osificación endocondral da origen a los huesos largos. La osificación intramembranosa se da mediante la mineralización directa de la matriz secretada por los osteoblastos y la endocondral es a través de la sustitución de un molde cartilaginoso preexistente (Gartner & Hiatt, 2011; Sepúlveda, 2013) los huesos de las extremidades y partes del esqueleto axial, que soportan el peso del cuerpo, se desarrollan por osificación endocondral; mientras que los huesos planos del cráneo, cara, maxilar y clavícula se desarrollan por la osificación intramembranosa (Ross & Pawlina, 2008).

#### 2.1.2.1.1 Osificación intramembranosa

La osificación membranosa comienza alrededor de la octava semana de gestión, el hueso se forma a través de la diferenciación de células mesenquimales, la zona donde se forma el hueso es conocido como el centro de osificación primaria. Las células mesenquimales tienen una forma estrellada, estas migran y se agrupan en áreas específicas, luego aumentan de tamaño y se tornan más redondas. Estas modificaciones dan origen a las células osteoprogenitoras que proliferan y se diferencian en osteoblastos, éstos comienzan la síntesis y secreción de colágeno y de proteoglicanos de la matriz ósea, una sustancia que no se encuentra mineralizada y recibe el nombre de osteoide. El proceso de mineralización comienza por el depósito de fosfato de calcio sobre el osteoide, se forman pequeñas espículas rodeadas de osteoblastos y al avanzar la osificación, los osteoblastos quedan encerrados dentro de los canalículos, y estas células reciben el nombre de osteocitos, por otra parte, las espículas pasan a ser trabéculas. Los espacios entre las trabéculas formadas se invaden de vasos sanguíneos que traen con ellos células indiferenciadas, las cuales se diferenciarán en células

sanguíneas, dando origen a la médula ósea del hueso esponjoso (Ross & Pawlina, 2008; Gartner & Hiatt, 2011).

#### 2.1.2.1.2 Osificación endocondral.

La osificación endocondral, comienza de la misma manera que la intramembranosa, la condensación de células mesenquimales, pero se van a diferenciar a células condrogénicas, que van a producir matriz extracelular formando un modelo de cartílago hialino, el cual tiene crecimiento aposicional e intersticial, aposicional es el crecimiento de cartílago nuevo sobre la superficie de un cartílago preexistente, y el intersticial que surge de la división mitótica de los condrocitos dentro de sus lagunas (Ross & Pawlina, 2008).

El aumento del espesor se debe principalmente al agregado de matriz cartilaginosa producido por condrocitos nuevos originados a partir de la capa condrogénica de pericondrio que rodea la masa del cartílago. Los centros de osificación primarios se localizan en las diáfisis en donde los condrocitos se hipertrofian y producen fosfatasa alcalina, comienza la calcificación de la matriz cartilaginosa, se inhibe la difusión de los nutrientes, por lo cual se ocasiona la muerte de los condrocitos en el modelo cartilaginoso. (Ross & Pawlina, 2008; Gartner & Hiatt, 2011; Jarquín, 2016)

Los osteoblastos, comienzan a sintetizar matriz extracelular y la formación de un collar óseo subperióstico alrededor de modelo cartilaginoso, es decir formando hueso. Se comienza la osificación en la epífisis, es decir, los centros de osificación secundarios y comienza el crecimiento de la placa epifisaria (Gartner & Hiatt, 2011; Sepúlveda, 2013).

### 2.1.2.2 Hueso esponjoso

El hueso esponjoso corresponde a la parte que contiene la cavidad medular y está formado por trabéculas, que son redes irregulares de placas delgadas con un alto grado de porosidad (Sepúlveda, 2013). Los espacios que se quedan entre las trabéculas están llenos de médula ósea y en estas trabéculas existen lagunas donde se localizan los osteocitos, los vasos sanguíneos del periostio penetran al hueso esponjoso y los osteocitos reciben su nutrición directamente de la sangre que circula por las cavidades medulares (Martínez, 2006).

### 2.1.2.3 Hueso compacto

El hueso compacto o maduro, como es comúnmente conocido, está compuesto por un sistema de laminillas circunferenciales externas e internas, osteonas/ sistemas de Havers y láminas intersticiales (Sepúlveda, 2013). Se localizan en las porciones externas de todos los huesos y posee una estructura dura que da rigidez. Las osteonas o sistema de Havers consisten en láminas concéntricas de la matriz ósea, contiene un canal central denominado conducto ostional o conducto de Havers, este tiene tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos y fibras nerviosas, están comunicados con el periostio y la cavidad medular (Ross & Pawlina, 2008).

Las laminillas circunferenciales siguen la totalidad de la circunferencia interna y externa de la diáfisis del hueso largo, existen otros tipos de canal, los conductos de Volkmann, que son túneles dentro del hueso laminar, que tiene como función comunicar los conductos de Havers entre sí (Brusco, et al. 2014). Las láminas circunferenciales externas, se encuentran por debajo del periostio y presentan fibras de Sharpey, que fijan hueso al periostio en los sitios de inserción tendinosa, las láminas circunferenciales internas, están situadas alrededor de la cavidad medular y a partir de estas se extienden trabéculas del hueso esponjoso (Sepúlveda, 2013).

## 2.1.3 Factores de Mineralización

### 2.1.3.1 Matriz orgánica

Representa cerca del 35% de la matriz extracelular, se compone de colágena principalmente tipo I y sustancias bases que contienen proteínas, agreganos, glicoproteínas específicas como se puede observar en la siguiente tabla (Sepúlveda, 2013; Navarro, 2005):

Tabla 1. Proteínas en la matriz extracelular ósea.

<b>Proteínas y factores que regulan el metabolismo celular óseo</b>	
<b>Proteína/Factor</b>	<b>Función</b>
<b>Osteopontina</b>	Unión celular, regulación de la mineralización
<b>Sialoproteína</b>	Unión celular, iniciación de la mineralización
<b>Osteonectina</b>	Unión al Ca, interacción fase mineral-colágeno, regulación de migración celular
<b>Tetranectina</b>	Regulación de la deposición mineral
<b>Trombospondina</b>	Modulación del metabolismo celular, unión al colágeno
<b>Osteocalcina</b>	Regulación de la maduración mineral
<b>Fibromodulina</b>	Interactúa con el colágeno de tipo I y II, unión a factores de crecimiento
<b>Osteoglicanos</b>	Unión a TGF- $\beta$
<b>Trombomodulina</b>	Interactúa con el colágeno tipo I y II, unión a factores de crecimiento
<b>Fibrilina</b>	Anclaje de fibras de elastina
<b>Vitronectina</b>	Adhesión
<b>Tenacina</b>	Diferenciación temprana de mesénquima
<b>Fibronectina</b>	Interacción matriz-célula
<b>Prostaglandina</b>	Reabsorción
<b>TGF-<math>\alpha</math> y <math>\beta</math></b>	Diferenciación y síntesis de proteínas
<b>BMP-27</b>	Diferenciación y maduración
<b>Calcitonina</b>	Formación y reabsorción
<b>Vitamina A</b>	Diferenciación
<b>Vitamina D</b>	Diferenciación, reabsorción, síntesis de proteínas

Tomada y modifica de Navarro, 2005.

### 2.1.3.2 Matriz inorgánica

La matriz inorgánica representa un 65% de la totalidad de la matriz, los principales compuestos son el calcio y fósforo que se encuentran de manera abundante y en

forma de cristales de hidroxiapatita que forman partículas en forma de agujas, dispuestos de manera ordenada a lo largo de fibras de colágena tipo I, esto le da la dureza y rigidez al tejido (Brusco, et al., 2004; Ross & Pawlina, 2008).

### 2.1.3.3 Mineralización

El hueso está compuesto por Calcio, Fosfato y Carbonato en porciones de 10:6:1 en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita, y en menor proporción se encuentra Magnesio, Sodio, Potasio y Flúor, la mineralización es el proceso en el cual se mineraliza la matriz extracelular orgánica, es un proceso regulado por las células del tejido óseo (Fernández, et al, 2006).

Ocurren dos etapas: la primera, comienza con la formación de cristales de hidroxiapatita dentro de las vesículas de la matriz, seguido por la propagación de la hidroxiapatita a través de la membrana de la vesícula dentro de la matriz extracelular (Negri, 2011).

La vesícula matricial cargada se rompe y produce un aumento en la concentración de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $\text{PO}_4^{+}$ , que estimula a los osteoblastos para que secreten fosfatasa alcalina que aumenta la concentración local de  $\text{PO}_4^{+}$  (Ross & Pawlina, 2008).

La fase de mineralización finaliza en 130 días en hueso compacto y en 90 días en el hueso trabecular.

Existen distintos factores que ayudan a este proceso:

- Factores genéticos: De 60 al 80% de la masa ósea se encuentran determinada genéticamente
- Factores mecánicos: El ejercicio físico moderado intenso tiene un efecto positivo sobre la masa ósea.
- Factores hormonales: Las hormonas actúan como mensajeros sistémicos, que ayudan a distancia de su lugar de producción, pero también regulan la



síntesis de acción de los factores locales. Entre estos, se encuentran: hormona tiroidea, estimula la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, también se produce un efecto contrario estimulando la reabsorción al aumentar el número y función de osteoclastos, paratohormona (PTH), estimula la secreción de RANKL, IGF-1 e Interleucinas por los osteoblastos, lo que activa la diferenciación y función osteoclástica, la Calcitonina, in vitro e in vivo inhibe la acción de los osteoclastos, etc.

- Andrógenos: Incrementa el tamaño y estimulan la formación, pero también tienen un efecto inhibitorio en la resorción ósea.
- Estrógenos: Pérdida de masa ósea que ocurre en los primeros años de la postmenopausia tras el cese de la actividad estrogénica, lo que ocasiona un aumento del remodelado debido a la elevación de distintas citoquinas. In vitro e in vivo, es la inhibición del desarrollo de los osteoclastos.
- Insulinas: Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente a través del aumento de la síntesis hepática del factor de crecimiento análogo a la insulina tipo 1
- Factores de crecimiento: Producidos por las propias células óseas, actúan como moduladores de las funciones celulares fundamentales sobre el crecimiento, diferenciación, proliferación celular. Existen distintos tipos de factores entre ellos, las BMPs de la 2-7, TGF- $\beta$ , FDG, VEGF, etc.
- Proteínas de la matriz: Actúan como moduladores de los factores de crecimiento. (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, et al., 2006; Reyes, et al., 2008)

#### 2.1.4 Propiedades Mecánicas del hueso

El tejido óseo se encuentra caracterizado por la mineralización del tejido y la rigidez que esta le confiere, cuenta con diferentes propiedades mecánicas, existe una complejidad en estas propiedades por la composición del tejido, es decir, hueso compacto y hueso trabecular. El hueso puede llegar a sufrir fracturas o defectos asociados a diferentes factores como la edad o diferentes patologías, por lo cual a través de diferentes materiales se busca llegar a la reparación ósea (Chabrand, 2018; Ross & Pawlina, 2008).

La biomecánica ósea es el estudio de los principios mecánicos que rigen el comportamiento de los huesos, es decir, estudia el efecto y la relación de la fuerza aplicada sobre una estructura y la deformación producida. Los huesos responden a las fuerzas aplicadas sobre su superficie siguiendo un patrón característico, la primer fase es la elástica, ésta dependerá de la rigidez del hueso, la deformación es temporal y se mantiene solo el tiempo de aplicación de la fuerza, se continua con la fase plástica y el hueso aunque se puede recuperar parcialmente pero queda un grado de deformación y cuando existe una fuerza superior a la resistencia del tejido, se produce una ruptura la que es conocida comúnmente como fractura (Serrano, 1998).

El comportamiento del tejido óseo frente a las fuerzas aplicadas sobre su superficie dependerá del tipo de hueso, densidad, arquitectura, composición ósea y sobre todo del tipo de fuerza aplicada. La fuerza o carga es un vector con una magnitud, dirección y punto de aplicación que cuando actúa sobre un cuerpo, esta puede clasificarse en: compresión, cuando el cambio en la forma del objeto se manifiesta en forma de acortamiento, tracción o tensión, es manifestado en forma de alargamiento y corte, donde se produce cizallamiento del objeto, se pueden realizar ensayos a través de instrumentos para obtener el módulo de Young, la deformación o la tensión de ruptura, así como el límite de elasticidad, el tejido óseo tiene definidos sus valores en los diferentes ensayos (Tabla 2) (Guede, et al, 2013).

**Tabla 2. Valores del tejido óseo en pruebas mecánicas**

Propiedad	Hueso cortical		Hueso trabecular
	Transversal	Longitudinal	
<b>Resistencia en compresión (MPa)</b>	106-133(MPa )	167-213( MPa )	50( MPa )
<b>Módulo de Young</b>	14,7-34,3 ( MPa )		
<b>Resistencia en tracción (MPa)</b>	51-56( MPa )	78-150( MPa )	8( MPa )
<b>Módulo de Young</b>	6-13( MPa )	14.7-34.3(MPa )	0.05-0.4(MPa )

Como se mencionó anteriormente existen diferentes pruebas para saber el comportamiento de un material, en este proyecto se trabajó con compresión y con tracción. El ensayo de compresión se emplea para estudiar el comportamiento del material, cuando está sujeto a una carga compresiva a una velocidad de carga relativamente alta y uniforme, esta prueba dará por resultado el esfuerzo máximo del material y el módulo de Young, el cual está definido como la fuerza elástica con respecto a la deformación elástica de manera que en cuanto menor sea la deformación, originada por la fuerza dada, mayor será el módulo de Young esto se expresa en unidades de fuerza por unidad de área (Guede, et al, 2013).

El ensayo de tracción brinda la respuesta de un material ante la fuerza que tiende a estirarlo, entre las propiedades mecánicas que se pueden medir en el ensayo de tracción destacan la elongación de ruptura, la tensión de ruptura, si la tensión de ruptura es alta el material es resistente y si es baja lo llamaremos débil, si la elongación a rotura es pequeña será material frágil y si se deforma mucho, antes de romperse hablaremos de un material dúctil. Esta prueba consta de un brazo fijo y uno móvil ambos usados con una mordaza, donde dispone una muestra de sección transversal, las mordazas se sujetan las probetas/muestras y los brazos se separan a una velocidad constante mientras se determina la carga y la extensión (Guede, et al, 2013).

En la ingeniería de tejidos óseos se han empleados diferentes materiales, los cuales buscan ser similares al hueso y es necesario que en la parte mecánica busquen la rigidez ya mencionada, para esto los materiales se someten a diferentes pruebas, las propiedades de estos dependen fundamental de la composición, estructura, condiciones, y factores donde influyen tiempo y temperatura. Para caracterizar un material para una aplicación determinada es conveniente estudiar su comportamiento y relación entre la fuerza o la tensión aplicada y los desplazamientos o deformaciones obtenidas, hasta la ruptura ante el tiempo (Chabrand, 2018).

Idealmente las propiedades mecánicas de un andamio óseo fabricado con diferentes materiales deben de ser semejantes con el sitio anatómico en el cual se implantará. La producción de matriz para el tejido óseo es un gran desafío y debe de presentar suficiente integridad mecánica para que funcione inmediatamente después de la implantación hasta el proceso final de la remodelación ósea.

#### 2.1.5 Reparación de fracturas

El tejido óseo está caracterizado por mostrar una rigidez, dureza y una capacidad de carga, pero en ocasiones puede llegar a sufrir fracturas. Una fractura se define como la discontinuidad en el hueso debido a golpes, fuerzas o tracciones que el hueso y el sistema de carga no puede soportar (Giraldo, 2004). El hueso puede regenerarse, al tiempo que necesita para su reparación se le conoce como consolidación ósea (Reyes, et al., 2008; Ross & Pawlina, 2008).

En la reparación de la fractura aparecen células y moléculas en el sitio de la lesión para repararla, se puede dar de dos formas:

Curación ósea directa/ curación primaria: Consiste en estabilizar completamente la zona afectada a través de compresión, restringiendo los movimientos de los fragmentos fracturados. Internamente el hueso sufre un remodelado, donde los conos de corte cruzan la línea de fractura y generan conductos de resorción longitudinales.

Curación ósea indirecta/ curación secundaria: usualmente para fracturas con una fijación no rígida o semirrígida. Al presentarse una fractura surge un hematoma con una respuesta inflamatoria y necrosis del tejido en los extremos de la fractura. La zona dañada presenta hipoxia debido a la ruptura de los vasos sanguíneos, una disminución de los macrófagos y las condiciones necesarias para que actúen los macrófagos y los leucocitos que eliminan detritus celulares que a su vez secretan factores que promueven la quimio taxis y la mitogénesis. Pasando 3 a 5 días de la lesión comienza la formación de un tejido granular el cual es tejido conjuntivo laxo con fibras de colágeno del tipo II y III, estas fibras de colágeno servirán como anclaje a las células que lleguen de vasos de diferentes tejidos, como lo son el periostio, endostio y médula ósea.

La maduración del tejido granuloso necesita de 2-3 semanas para su maduración formando un “Callo blando” el cual es fibrocartílago que tiene como función estabilizar y unir el hueso fragmentado. Mientras continua la formación del callo, las células osteoprogenitoras del periostio se dividen y se diferencian en osteoblastos que producirán osteoide en la parte superficial exterior de la fractura. Los brotes osteogénicos del nuevo hueso envuelven el callo y comienzan a depositar tejido óseo dentro del mismo, el callo blando pasa a ser callo duro. La proliferación y diferenciación del endostio se producen en la cavidad medular y el hueso crece en ambos extremos de la fractura hacia el centro (Gutiérrez, 2008; Ross & Pawlina, 2008; Junquera, 2013).

## **2.2 Ingeniería de tejidos**

La IT se encuentra definida como un área de la medicina regenerativa, donde el objetivo principal es la restauración, reparación de las actividades funcionales de órganos y tejidos. Los tejidos se encuentran de forma natural conformados de células y la MEC, estos pueden ser perdidos o afectados, por enfermedades congénitas, degenerativas, traumatismos o neoplasias. La IT es una alternativa para la regeneración y la formación de nuevos tejidos a través de estructuras tridimensionales o matrices enriquecidas realizadas en laboratorios, evitando el

rechazo inmunológico, la transmisión de enfermedades e involución del material de los injertos existentes (Navarro, M.,2005; Morales,2014; Serrato, et al., 2015).

### 2.2.1 Pilares

La ingeniería de tejidos se compone básicamente de 3 partes a) las células, b) los biomateriales y c) los factores de inductivos (Esquema 1).

La ingeniería de tejidos se encarga del desarrollo de los biomateriales como una matriz tridimensional o un andamio, como son conocidos comúnmente. Estos andamios proporcionan un soporte tridimensional a las células para la formación de nuevo tejido, la matriz debe replicar el microambiente celular del tejido natural para la estimulación de la matriz extracelular, por lo cual debe permitir una adecuada regulación celular, adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular, así como la señalización biológica requerida para la conservación de la expresión génica específica para definir la arquitectura del tejido (Fabres,,2010; Saucedo, et al.,2013).

Las matrices creadas son sistemas que deberán contar con las características físicas, mecánicas y biológicas similares a la matriz extracelular (MEC) (Serrato, et al., 2015; Llanos, 2015)

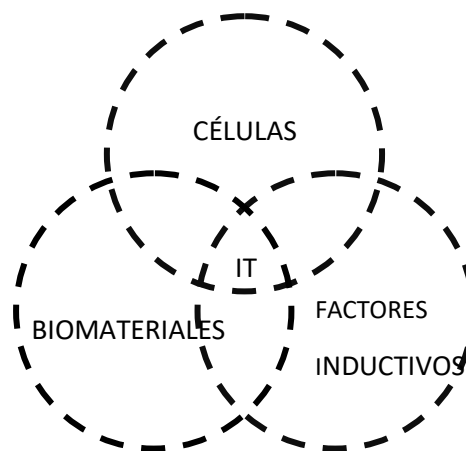


Figura 1. Triada de la IT

### 2.2.1.1 Células

Las células son el primer pilar dentro de la IT, la creación de la matriz extracelular ocurre gracias a las diferentes células maduras de los tejidos, ya que su función radica en la creación de la MEC a través de diferentes procesos. La incorporación de las células en un principio ocurría utilizando células del tejido lesionado, pero al tener lesiones tan grandes o no poder tener la extracción de estas células se buscó otra forma de poder obtener células. Las células deben presentar la capacidad de proliferación y crecimiento en cultivo especialmente, entre las cuales destaca el uso viable de las células troncales. (Serrato, et al., 2015)

Las células troncales son células primitivas, indiferenciadas y totipotenciales, con la capacidad de división, multiplicación y diferenciación a células de diferentes linajes, estas células pueden ser clasificadas por el origen:

- Embrionario: Se encuentran en el macizo celular interno del blastocito, cuentan con un gran potencial de replicación, y proliferar en un estado indiferenciado. Se pueden reproducir de forma ilimitada si están en cultivo celular, es decir, en forma in vitro. De carácter pluripotencial.
- Adulto: son conocidas como postnatales o somáticas, se encuentran en todos los tejidos y cuentan con una capacidad de regeneración, especialmente, en médula ósea, tejido graso y conjuntivo. Son de carácter multipotencial. (Fabres, 2010; Kasper et al., 2016).

También se pueden clasificar por el potencial de diferenciación:

- Totipotencial: Cuentan con la capacidad de dar nuevos embriones y formar un organismo completo, ya que pueden diferenciarse a tejido embrionario y extraembrionario. Estas células son obtenidas en las primeras etapas del estado embrionario, cuando el óvulo fecundado está en el proceso de segmentación.

- Pluripotencial: Estas células se pueden diferenciar en cualquier célula de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo, mesodermo.
- Multipotencial: Son células capaces de generar células de su propia línea embrionaria. También son denominadas como células madres órgano-específicas, pueden generar un órgano en su totalidad.
- Unipotencial: También llamadas oligopotencial, son las células que presentan menor potencialidad debido a que solo pueden diferenciarse a un linaje (Pimentel-Parra y Murcia-Ordoñez, 2017).

La otra opción es el uso de líneas celulares ya comercializadas como pre-osteoblastos, fibroblastos, o condroblastos, son células ya listas para su uso (Serrato, et al., 2015).

#### 2.2.1.2 Biomateriales

Se designa el término biomaterial a aquellos materiales que son empleados para reproducir la función de tejidos vivos en sistemas biológicos de forma segura, la función principal es actuar de manera similar a la matriz extracelular nativa, es decir, procurar la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de las células, se deben de contar con propiedades mecánicas como: permeabilidad, estabilidad de elasticidad, visco elasticidad, flexibilidad resistencia al desgarre, resistencia al esfuerzo, tracción, plasticidad, entre otras para actuar como soporte de las células y dar el ambiente necesario para el crecimiento del tejido que se busca reparar o sustituir (Serrato, et al., 2015).

El uso de materiales para el uso médico remonta desde el antiguo Egipto y durante civilizaciones clásicas, como las griegas, las romanas en Europa y en el siglo XVI, el oro y la plata se emplearon para reparaciones dentales y posteriormente el hierro, para la inmovilización de fracturas óseas. Para el siglo XIX se desarrollaron aleaciones con propiedades mecánicas mejores y más resistentes, a principios del siglo XX con el descubrimiento de materiales se logró fabricar hilos de sutura capaces de ser degradados y absorbidos por el organismo (Lizarbe,2007), en los años 60's y 70's, tuvo lugar la primera generación de



biomateriales donde la meta era obtener materiales cuyas propiedades físicas se adaptarían lo mejor posible a las del tejido a reemplazar a reaccionar mínimamente con el tejido circundante, es decir, materiales inertes, a partir de los años 80 surgió una segunda generación de biomateriales esta vez el objetivo era crear materiales bioactivos como los vidrios bioactivos de silicio y la hidroxiapatita, principalmente durante la segunda generación también tiene lugar los materiales absorbibles, como los polímeros biodegradables. La tercera generación de biomateriales, los materiales buscan interactuar con el tejido de forma específica mediante estímulos a nivel celular y molecular y combinan las propiedades de bioseguridad y de actividad dentro del mismo material, se busca un biomaterial ideal que cumpla con ciertas características necesarias para el tejido, entre las cuales se encuentran (Navarro, 2005)

Actualmente nos encontramos en la cuarta generación que pretende obtener materiales que interactúen en profundidad con los sistemas biológicos mediante la regularización del proceso biológico, integrándose en el organismo y con una capacidad de degradarse y de luchar contra las infecciones. Se denominan materiales inteligentes, ya que adaptan sus propiedades al estímulo exterior o contienen sensores para vigilar las funciones e interactuar con los sistemas biológicos.

- Biocompatibilidad: Se busca que el material no induzca efectos nocivos, como reacciones inadecuadas de carácter inmunitario, infeccioso, tóxico o inflamatorio cuando se integre el material al tejido del huésped
- Biodegradabilidad: Si es necesario que el andamio sea degradado, se busca qué a través de procesos fisiológicos, destrucción y eliminación por enzimas se degrade/ reabsorba el material.
- Resistencia y propiedades mecánicas: los biomateriales deben de soportar las fuerzas a las cuales sean sometidos para poder ejercer su función.

- Manufacturabilidad: los procesos por el cual se fabrica el material deben de ser relativamente sencillos a la manufactura, reproducible económica y actualmente de carácter ecológico.
- Diseño y estructura: este debe ser adecuado de acuerdo con el tejido a reparar, esto engloba al tamaño y forma, las dimensiones deben de cumplir con los requerimientos y características biológicas del tejido (Lizarbe, 2007).

Existen diferentes materiales usados en la ingeniería de tejidos, los cuales han sido clasificados de acuerdo con su origen:

- Cerámicas: son compuestos inorgánicos formados a altas temperaturas que contienen elementos metálicos y no metálicos, con estructura cristalina, como alúmina, zirconio, hidroxiapatita (HA), y fosfatos de calcio. (Martin-Piedra & Martin-Piedra, 2019). Son materiales que son mecánicamente débiles, su uso radica que es un material químicamente inerte, es decir, no suelen desencadenar una respuesta inmune o no deseadas en el tejido y no susceptibles de un ataque microbiano (Lizarbe, 2007).
- Metales: Para poder utilizar este material se debe de tomar en cuenta la magnitud y la dirección de las fuerzas sobre el tejido que se quiere trabajar, las limitaciones del mismo y buscar el mejor diseño anatómicamente. Puede sufrir corrosión y liberación de productos al medio y produciendo una reacción tisular. Han sido utilizado ampliamente para la corrección de daños del cráneo y la fijación interna de fracturas (articulaciones, placas craneales, clavos) (Lizarbe, 2007).
- Compuesto (Composites): Es la unión de diferentes materiales, juntando sus ventajas y minimizando las desventajas. Los polímeros naturales o sintéticos a menudo se combinan con componentes inorgánicos, como cerámicas de FC o biovidrios (Lizarbe, 2007; Martin-Piedra & Martin-Piedra, 2019)

- Polímeros: Son macro estructuras compuestas de pequeñas unidades repetitivas conocidas como “monómeros”, se cuenta con polímeros de origen “biológico” y “sintéticos” (Lizarbe, 2007).

### 2.2.1.3 Factores de crecimiento

El microambiente in vivo que rodea a las células es rico en señales biomoleculares, una variedad de proteínas y nucleótidos, estos, contribuyen funciones celulares específicas, entre ellas la diferenciación, proliferación y sobrevivencia celular, además no solo es la inducción sino también se puede dar la inhibición de las mismas funciones según sea la vía de señalización. Estos son secretados de forma endógena por la célula o de forma parácrina de células vecinas (Serrato, et al., 2015; Morales, 2014).

Estas señales o proteínas, son conocidas como factores de crecimiento que pueden actuar como mitógenos promoviendo la proliferación de ciertos tipos de células o como morfógenos induciendo el cambio en el fenotipo de las células blanco, dentro de la ingeniería de tejidos se pueden adicionar de forma adecuada (Estrada, et al., 2006). Dentro de la ingeniería de tejidos ósea se han empleado varios factores de crecimiento

**Tabla 3. Factores de crecimiento relacionados con el tejido óseo.**

	<b>Estimulan Formación</b>	<b>Estimulan reabsorción</b>
<b>FACTORES DE CRECIMIENTO</b>	BMP-2 (Proteína morfogenética ósea-2)	TNF (Factor de necrosis tumoral)
	BMP-4 (Proteína morfogenética ósea-4)	EGF(Factor de crecimiento epidérmico)
	BMP-6 (Proteína morfogenética ósea-6)	PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)
	BMP-7 (Proteína morfogenética ósea-7)	FGF (Factor de crecimiento fibroblástico)
	IGF-I (factor análogo a la insulina I)	M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos)
	IGF-II (factor análogo a la insulina II)	GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)
	TGF- $\beta$ (Factor transformante del crecimiento $\beta$ )	
	FGF (Factor de crecimiento fibroblástico)	
	PDGF (Factor de crecimiento de las plaquetas)	
	VEGF (Factor de crecimiento	

	vascular endotelial)	
--	----------------------	--

Tomada y modificada de: Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, et al., 2006.

## 2.2.2 Biomateriales en tejido óseo

En la reparación ósea se han empleado diferentes polímeros, dentro de los de origen naturales se encuentran ácido hialurónico, fibrina, heparina, quitosán, alginato, agarosa, colágeno, gelatinas, fibroína de seda, quitina. Entre los polímeros sintéticos: ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico(PGA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), fumarato de polipropileno (PPF), poliuretano poroso (PPS), polioctoésteres (POE) y plasma pobre en plaquetas (PPP) (Martin-Piedra & Martin-Piedra, 2019).

### 2.2.2.1 Polímeros

Dentro de los materiales utilizados para aplicaciones biomédicas los polímeros se sitúan en las primeras opciones, estos son grandes bio moléculas compuestas de repeticiones de pequeñas unidades llamadas meros (monómeros), los cuales se encuentran entrelazados por enlaces covalente. Se clasifican en sintéticos y naturales, los polímeros sintéticos se dan por el proceso de polimerización y se unen a uno o tres diferentes unidades (Hermida, 2011; Beltrán and Marcilla, 2012). Mientras que los polímeros naturales o de origen biológico, se encuentran de forma natural en los tejidos animales como: tendones, piel, hueso, cartílago, etc. Dentro de estos de estos biomateriales destacan por sus aplicaciones el ácido hialurónico, colágena, fibronectina, gelatina. No presentan modificaciones a comparación de los sintéticos y con estructuras más complejas. Los biopolímeros cuentan con propiedades bioactivas que facilitan la interacción con las células, se van a dividir en:

- Proteínas
- Polisacáridos
- Poli nucleótidos (Hermida, 2011; Vazqu ez,2019)

#### 2.2.2.1 Gelatina

La gelatina es un polímero natural que se obtiene mediante la hidrólisis parcial de la colágena encontrada en piel, hueso, cartílago o ligamento de todos los animales, la colágena, es una proteína estructural que se encuentra en la MEC de tejidos fibrosos en algunos de los tejidos del cuerpo humano, esta proporciona resistencia mecánica y rigidez. Cada molécula de colágena está conformada por tres cadenas poli peptídicas llamadas cadenas  $\alpha$ , estas se unen para formar una triple hélice dextrógira, en temperaturas similares la colágena y la gelatina mantienen una estructura similar, y esta puede inducir a una red tridimensional. (Jarquín, 2016; Olivares, 2017) Siguiendo con su estructura química aparecen residuos de lisina y glutamina, que presentan grupos amino libre que pueden actuar como puntos de entrecruzamiento y así obtener un gel, andamio, mucho más estable. (Sebastián et al, 2016).

Dentro de sus principales propiedades, cuenta con buena procesabilidad, transparencia, biodegradabilidad, absorción, biocompatible y reabsorbible por el organismo, no es antigénica, lo cual es bueno ya que no provoca una respuesta inmune específica, que podría ser esperado por ser un producto derivado de la colágena y que si es antigénica (García,1997; Rosado, 2013; Sebastián et al, 2016). La gelatina, tiene propiedades de adhesión de aminoácidos arginina-glicina-acido aspártico (Secuencias RGD) las cuales son reconocidos por las integrinas, que son glicoproteínas transmembranales que activan vías de se nalizaci n intracelular para activar la proliferación, diferenciación y migración (Olivares, 2017).

Las aplicaciones de la gelatina en regeneración ósea han sido ampliamente utilizadas, Askarzadeh, et al., en el 2004 y su equipo de trabajo realizó un andamio poroso de gelatina combinado con una cerámica, encontrando que a mayor concentración de gelatina existe una mayor cantidad de poros y mayor interconectividad favoreciendo la adherencia y proliferación celular.

Por otro lado, Moinsenovich et al., 2014, a través del método de liofilización realizaron un andamio compuesto de fibroína, gelatina e hidroxiapatita obteniendo un andamio biocompatible, resistente y poroso, que permitió la adherencia y crecimiento celular.

#### 2.2.2.2 Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (AH) es un polisacárido de una cadena larga, constituido por unidades repetitivas de disacáridos repetitivas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina (Jarquín, 2016). Es importante en la organización estructural de la matriz extracelular, debido a el transporte de iones, absorción de nutrientes y que permite la difusión del líquido tisular en el intersticio de los tejidos y órganos, además tiene la capacidad de retener agua, esto se debe a que en todo su esqueleto poseen abundantes cargas negativas provenientes de los grupos carboxilos (Olivares, 2017). Aparte de las múltiples funciones mencionadas, el ácido hialurónico regula diferentes actividades celulares a través de receptores específicos e interacciones con otras moléculas de la matriz extracelular, dentro de sus receptores de membrana se encuentra uno específico, que es perteneciente a la familia de glicoproteínas de adhesión CD44, este permite que las células se unan al ácido hialurónico (Carro, 2002).

El AH tiene ciertas propiedades como alta viscosidad, alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, solubilidad en agua, no inmunogénico, no trombo génico, promueve la migración celular y degradación en modelos in vivo (Sebastián et al, 2016), por un grupo de enzimas denominado hialuronidasas (Carro, 2002).

Por las múltiples propiedades que conlleva el ácido hialurónico, lo hacen un material de para distintas aplicaciones, entre estas: tratamientos estéticos,

cicatrización de heridas y en la ingeniería de tejidos, dentro de esta, se puede realizar la fabricación de andamios, geles, hidrogeles y micropartículas. En este trabajo se ha considerado porque promueve la diferenciación de células madre a condroblastos y osteoblastos (Jarquín, 2016).

#### 2.2.2.3 Quitosán

La composición del Quitosano está distribuida de forma aleatoria entre unidades moleculares de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) D-glucosamina y N-acetil- D-glucosamina. Este compuesto demuestra mayor versatilidad que la celulosa para reacciones químicas, debido a las posibles sustituciones en los sitios activos aminos ubicados en la posición C2, y a varios grupos hidroxilos también disponibles. El Quitosano es un polímero insoluble a pH neutro y básico debido a sus enlaces intra e intermoleculares formados por puentes de hidrógeno. Su forma cristalina y grupos amino protonables ( $-NH_3^+$ ), permiten que sea soluble en soluciones acuosas ácidas, ya que se incrementa la polaridad y las repulsiones electrostáticas, lo que facilita la formación de asociaciones interpoliméricas (Romero-Serrano y Pereira, 2020).

La obtención del quitosán es a través de la hidrólisis parcial de la quitina, el cual es un compuesto blanco, duro e inelástico, y es un componente estructural de los exoesqueletos de artrópodos como cangrejos, camarones, langostas y moluscos (calamares, ostras, sepias, cefalópodos). También es extraído de las paredes celulares de los hongos, así como se encuentra en la matriz extracelular de una variedad de invertebrados incluidos insectos, poríferas (esponjas), platelmintos y nematodos, acompañada principalmente de carbonato de calcio y proteínas en la mayoría de estos organismos. (Mármol, et al., 2011; Hidalgo, 2015; Romero-Serrano y Pereira, 2020).

El quitosán es biodegradable, no tóxico, biocompatible, semipermeable, con propiedades filmogénicas, antimicrobianas, lo que convierte en un material versátil, además presenta la habilidad de ligar lípidos. Algunas aplicaciones para estos derivados, incluyen: la preservación de alimentos, biotecnología,

suplementos dietéticos, anti hongos y antibacteriales; fabricación de cosméticos, antioxidantes, fabricación de películas para empaques, nano fibras para la industria textil. (Mármol, et al., 2011; Hidalgo, 2015; Romero-Serrano y Pereira, 2020). Al emplearlo en regeneración ósea se ha visto que los grupos activos de amina e hidroxilo promueven el crecimiento de osteoblastos y la formación ósea in vivo. Además de ayudar a la diferenciación y morfogénesis de los osteoblastos, debido a las similitudes estructurales con los glucosaminoglucanos, uno de los componentes de la matriz orgánica del tejido óseo (Maji et al., 2015).

## **2.3 Microesferas**

La micro encapsulación es una técnica que permite recubrir sustancias en estado sólido, líquido, gaseoso, con un revestimiento de material de diferente naturaleza, incluyendo polímeros sintéticos, proteínas y polisacáridos. Dependiendo el tamaño de las micro partículas, se clasificarán en micro capsulas o microesferas (Sáez, et al., 2007).

Las microesferas se encuentran definidas como partículas esféricas análogas de micro cápsulas, pero sin la distinción clara entre el núcleo y la pared, son sistemas matriciales de liberación controlada. Estos sistemas han sido útiles y utilizados de manera exitosa para encapsular una amplia variedad de principios activos, incluyendo: efectos antiestáticos, antiinflamatorios, péptidos, hormonas, entre otros. Se pueden realizar de diferentes materiales, entre los más utilizados, son los polímeros, ya sean de origen natural o sintético (Ramos, et al., 2001; Sáez, et al., 2007).

### **2.3.1. Elaboración de las microesferas**

Las microesferas se pueden realizar por diferentes métodos:

- Gelificación iónica: Es una técnica basada en las interacciones iónicas entre los grupos aminos con diferente carga iónica.



- Coacervación: Se basa en la inducción de la de solvatación parcial del material de cubierta, continua con el depósito en la superficie de las partículas o gotículas de la sustancia llevará a la separación de fases que puede ser inducida de diversas formas, a diferencia, en la coacervación compleja la separación de fases ocurre de forma espontánea cuando en un medio acuoso se mezclan las dos, al ser los polímeros de cargas opuestas.
- Secado por atomización: el principio activo se disuelve, se dispersa en una solución del material de recubrimiento, esta mezcla se pulveriza dentro de una cámara cuyo interior circula aire caliente de esta manera el disolvente se evapora y se obtienen las microesferas
- Emulsión agua- aceite (w/o): que consiste en una fase acuosa y adicionar una fase oleosa, como primer paso el material escogido, en este caso el polímero y el principio activo se emulsifican, se añade un tensioactivo formando un fase acuosa, posteriormente se entra a la fase oleosa, donde se extrae/evapora el solvente, pasa por la suspensión de las microesferas y una serie de lavados y centrifugados hasta obtenerlas, en algunas ocasiones las microesferas pueden tener un proceso de reticulación para obtener mayor rigidez y estabilidad (Ramos, et al.,2001; Sáez, et al.,2007; Banerjee, et al., 2009).

Para utilizar cualquiera de estas técnicas hay que tomar en cuenta: el tamaño y distribución de tamaños de las microesferas esperadas, propiedades de superficie, carga de principio activo, velocidad de liberación del principio activo y velocidad de degradación de la matriz (Ramos, et al., 2001).

### 2.3.2 Degradación de microesferas

Generalmente la liberación de principios activos dentro de una microesferas es por la difusión a través de la matriz del polímero, así como a través de los poros de la estructura del polímero o la degradación del mismo polímero. (Sáez, et al., 2007).

El mecanismo de liberación de principios activos puede verse como en 3 etapas:

1. Una liberación inicial del principio activo enlazado a la superficie o embebida en la región superficial de la ME.
2. Liberación difusional del principio activo a través de la matriz del polímero y a través de los poros durante la degradación de la matriz.
3. Liberación erosional del principio activo por la desintegración de la matriz del polímero y disolución después que la matriz pierde su integridad y las cadenas del polímero son degradadas a un tamaño lo suficientemente pequeñas como para ser solubilizadas.

Todas estas etapas pueden desempeñar una parte importante en el proceso de liberación, lo que depende de la naturaleza del principio activo encapsulado, las propiedades físico-químicas del polímero y la estructura de la ME. (Sáez, et al., 2007; Ramos, et al, 2000)

En diferentes proyectos de ingeniería de tejidos se han empleado el uso de las microesferas, incorporados en andamios de diferentes materiales, por ejemplo, en 2009, Banerjee, et al., emplearon microesferas en un andamio de gelatina, con el objetivo de ver como las microesferas pueden cambiar o modular las propiedades mecánicas del andamio. También se ha mencionado que las microesferas pueden cambiar la topografía del andamio y esto podría tener consecuencias en la adherencia y proliferación celular.

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La ingeniería de tejidos ósea es una rama de la medicina regenerativa que tiene como propósito la reparación o sustitución de un tejido cuando ha sufrido un daño, para ello se hace necesarios la creación de diferentes andamios que brinden las características físicas, mecánicas y biológicas funcionales que favorezcan la diferenciación y proliferación celular empleando biomateriales de origen natural que simulen la matriz extracelular de este tejido.

## 4. HIPÓTESIS

El andamio de gelatina-ácido hialurónico (Ge-AH) con microesferas de quitosán brindará las características físicas, mecánicas y biológica para el cultivo de células troncales de médula ósea.

## 5. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

- Construir y caracterizar física, mecánica y biológicamente un andamio poroso de Ge-AH con microesferas de quitosán.

### **Objetivos particulares:**

- Obtener microesferas de Quitosán y agregarlas al andamio de Ge-AH , para aumentar la superficie y la topografía del mismo
- Evaluar el diámetro y profundidad del poro, degradación, tensión y compresión del andamio de Ge-AH con microesferas de quitosán.
- Evaluar el fenotipo de células troncales de médula ósea de rata Wistar para cultivarlas sobre los andamios de Ge-AH
- Evaluar la citotoxicidad del andamio de Ge-AH con microesferas de quitosán sembradas con células de médula ósea.
- Evaluar la presencia de células estromales de médula ósea en el andamio de Ge-AH con microesferas de quitosán a 14 días.

## 6. MÉTODO

Lista de reactivos e instrumentos utilizados durante este proyecto.

### *Reactivos*

- *Gelatina*
- *Ácido Hialurónico*
- *EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboimida*
- *Glutaraldehído*
- *Quitosan, Sigma Aldrich*
- *Albumina*
- *Ácido acético*
- *Aceite mineral*
- *Spam 80*
- *Hexano*
- *Agua destilada*
- *Medio DMEM alto en glucosa*
- *Antibiótico*
- *Suero bovino Fetal*

### *Instrumentos*

- *Vortex Mixer, Ultracruz TM*
- *Microcentrifuga, LabNet*
- *Liofilizadora, SCAN.V.AC*
- *Ultraturrax, IKA T25*

- Agitadora magnética, IKA WERKE.
- Microscopio Electrónico de barrido, marca JEOL, modelo JSM5600LV
- Máquina de pruebas universales INSTRON modelo 5567

### **6.1. Metodología específica**

#### *Obtención de microesferas de Quitosán.*

Las microesferas de quitosán, se realizaron a través del método de emulsión simple (w/o), el cual consiste en dos fases, una acuosa y la otra oleosa.

Para la fase acuosa se midieron 9.8ml de agua destilada con 0.01g de albúmina en una probeta, esto se colocó en un vaso de precipitado, al cual se le agregó también el quitosán (Sigma Aldrich) al 2% y se dejó hidratar durante una hora, posterior a este tiempo se puso a agitar la solución con mosca magnética a 750 rpm por una hora en una plancha magnética, finalmente se agregaron 200µl de ácido acético, dejando la solución en agitación constante durante 12 horas. Esta solución se colocó en una jeringa de 10ml almacenándolo hasta su uso.

Por otra parte, la parte oleosa fue constituida por 99ml de aceite mineral con 1ml de SPAN 80, se colocaron en un vaso de precipitado sobre la plancha magnética y se puso a agitar con mosca magnética a 750rpm durante diez minutos, posteriormente la solución se pasó al Ultraturax, para ser agitado a una velocidad de 10,200 rpm, en ese momento se le agregó el quitosán contenido en la jeringa, gota por gota y después se homogenizó la mezcla con el mismo instrumento, pero subiendo la velocidad a 12,200rpm durante un minuto, checando la temperatura, después la solución se cambió a la plancha magnética para mantener agitándola con la mosca a 750rpm por media hora, finalmente a esa solución en agitación se le incorporó 10ml de glutaraldehído, gota por gota, dejándose agitar durante tres horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se procedió a obtener las microesferas mediante la centrifugación de la solución a 4000rpm durante 10 minutos en la centrífuga, posterior a ello se realizaron varios lavados; uno de hexano y dos de agua destilada, obteniendo así las microesferas libres de la solución oleosa y del glutaraldehído, los últimos dos lavados con agua

destilada de las microesferas se centrifugan por media hora cada uno, en la microcentrífuga, y se almacenan hasta su uso.

- Evaluación morfológica de las microesferas de Quitosán

Para evaluar la morfología de las microesferas de quitosán, se tomaron 50 micros litros de ellas y se colocó en una rejilla, dejándose secar y posteriormente la rejilla con las microesferas se recubrieron en oro por 1 minuto. Las muestras fueron observadas en microscopio Electrónico de Barrido de bajo vacío, LV-5600, que se encuentra en el Laboratorio Central de Microscopia Óptica en el Instituto de Física, UNAM

- Construcción de andamio de Gelatina-Ácido Hialurónico, con microesferas de Quitosán.

La construcción del andamio de gelatina-ácido hialurónico con las microesferas se realizó preparando una solución de gelatina-ácido hialurónico con agua destilada en una proporción 4:1 respectivamente, se dejaron agitando a baño maría en la plancha magnética con una mosca a una temperatura no mayor a 60°C, al estar completamente homogeneizados. Se agregaron las microesferas en un volumen de 500uL y se dejó agitando por más de 1h, posteriormente se colocó 1ml de la solución en tubos Eppendorf con ayuda de una jeringa, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 1 h y se guardaron a una temperatura de 20°C hasta el día siguiente. La solución de gelatina-ácido hialurónico con las microesferas contenida en el eppendor fue liofilizadas durante 10 h, con presión 0.02hPa y temperatura de -110°C, de esta manera se obtuvo el andamio, posteriormente los andamios se entrecruzaron con EDC a diferentes concentraciones 6, 30, 50, 60mM disuelto en alcohol al 96%, los andamio con el entrecruzante se almacenaron a 20°C durante 12h, después de este tiempo, se realizaron tres lavados con agua destilada para retirar el EDC.

Finalmente se volvieron a liofilizar los andamios entrecruzados por 10 h y fueron cortados a una altura de 2mm y un diámetro de 9mm.



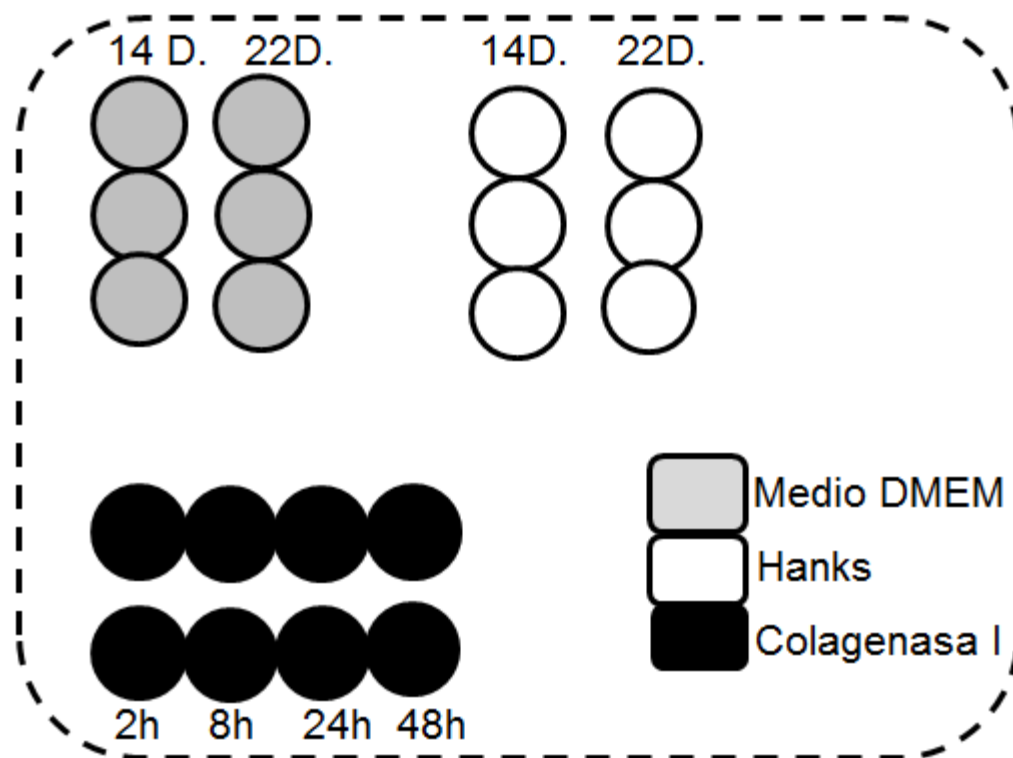
- Evaluación de tensión y compresión de un andamio de Gelatina-Ácido Hialurónico con microesferas de Quitosán

Las muestras para las pruebas de tensión fueron de 13 a 15mm de largo por 2mm de ancho y para compresión fueron de 10mm de largo por 9mm de ancho. Estas pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio de materiales dentales en el Posgrado de Odontología, UNAM. Se utilizó la máquina universal de pruebas mecánicas INSTRON modelo 5567 (E.U.A). Se analizaron los datos en un programa Software de operación para pruebas de Tensión y Compresión para modelo 5567 INSTRON. En el caso de la prueba de compresión, la velocidad cruceta fue de 1.0 mm/min.

El esfuerzo de tensión o de compresión se obtuvo al dividir la fuerza entre el área transversal de cada muestra. La deformación de tensión o de compresión se calculó al dividir el desplazamiento entre la longitud entre marcas fijada en cada probeta. Tanto el valor de fuerza como del desplazamiento se obtuvieron de la curva fuerza-desplazamiento que cada probeta o muestra arrojó al experimentar el movimiento en tensión o en compresión. Con los valores de esfuerzo y su correspondiente deformación se construyó la curva esfuerzo-deformación. Se hicieron 20 probetas por cada prueba.

- Evaluación del tiempo de degradación in vitro de un andamio de Gelatina-Ácido Hialurónico con microesferas de Quitosán.

Se ocuparon 80 andamios de Ge-Ha con microesferas de quitosán, con un diámetro de 9mm y 2 mm de altura y un peso de 0.0075 gr, con un total de 20 andamios por cada concentración de EDC (6, 30, 50 y 60mM), los cuales fueron esterilizados por 2 periodos de 15 minutos cada uno con luz UV, todos los andamos fueron colocados en cajas de 48 pozos, organizados de la siguiente manera: 6 andamios cultivados con medio DMEM alto en glucosa dividido en 3 para 14 días y 3 para 22 días; 6 andamios cultivados con buffer salino, 3 para 14 días y 3 para 20 días, finalmente, 8 andamios fueron cultivados con colagenasa tipo 1, de los cuales, 2 andamios se ocuparon para cada tiempo 2, 8, 24 y 48h (Figura 2)



**Figura 2. Representación gráfica de la prueba de degradación in vitro de andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán entrecruzado a diferentes concentraciones de EDC.**

Transcurrido el tiempo establecido, se retiraron los andamios de las soluciones, se dejaron secar en la estufa a 37°C por dos horas y se pesaron en la balanza analítica. El cálculo del porcentaje de degradación se obtuvo de la siguiente manera: peso seco inicial menos peso seco final, entre peso inicial.

- Evaluación de la morfología el andamio de Gelatina-Ácido Hialurónico con microesferas de Quitosán a través de microscopía electrónica de barrido (MEB).

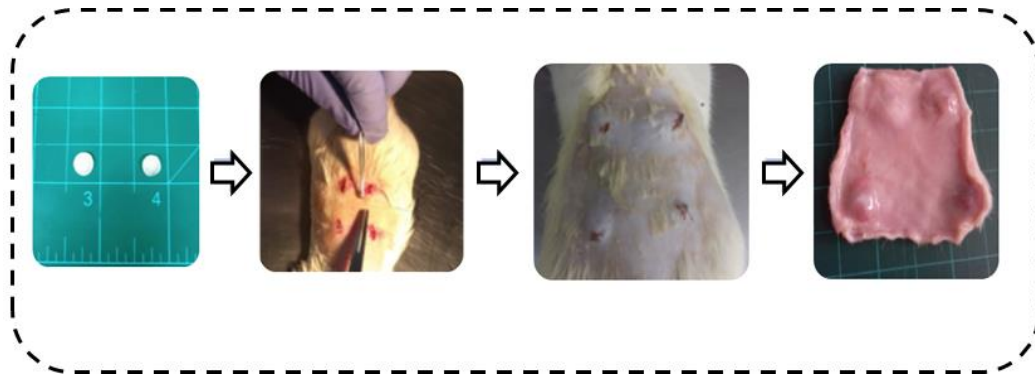
Los andamios de gelatina-ácido hialurónico con las microesferas de quitosán entrecruzados con EDC fueron cubierto con carbono para ser observados en el microscopio Electrónico de Barrido de bajo vacío, LV-5600 en el laboratorio de Microscopía Óptica en el Instituto de Física, UNAM.

*-Evaluación del diámetro y profundidad del poro de un andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán*

Para la obtención del diámetro y profundidad del poro del andamio se realizó una tomografía por coherencia óptica en el Laboratorio de Micro y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México con andamios de 9mm de diámetro por 2mm de ancho, el principio de esta técnica es que el rayo láser atraviesa el andamio de forma longitudinal. Se obtuvieron los valores en mm, con un equipo Ganymede II de ThorLabs, con un objetivo de 20x de marca Mitutoyo. Por otro lado, para complementar el tamaño de poro se utilizaron las fotomicrografías obtenidas de microscopía electrónica de barrido y se analizaron por triplicado en el programa *Imagen Pro-Plus*, obteniendo el promedio del tamaño de poro.

*- Evaluación del tiempo de degradación in vivo de un andamio de Gelatina-Ácido hialurónico con microesferas de quitosán.*

Los andamios de Ge-HA de 9mm de ancho por 2mm de grosor se implantaron subdérmicamente en ratas Wistar machos de dos meses de edad, las cuales fueron anestesiadas con Fenobarbital (2mg/Kg de peso), para realizarles incisiones subcutáneas en la parte dorsal, donde se colocó el andamio previamente esterilizado, posterior a ello se procedió a suturar con nylon 000. Los animales fueron sacrificados a los 7, 14 y 30 días, las muestras de la piel con el andamio fueron obtenidas y fijadas con formol al 10% para ser procesadas por técnica histológica convencional y teñidas con H&E.



**Figura 3. Figura ilustrativa de la prueba de degradación in vivo de andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán entrecruzado con 50mM de EDC.**

**- Obtención de células troncales de médula ósea de rata Wistar**

Las células troncales de médula ósea fueron obtenidas del fémur y tibia de las ratas Wistar, macho de mes y medio de edad, las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical, el trato con los organismos fue llevado ética, responsabilidad y cuidado. Por medio de la perfusión de medio de cultivo a los huesos fémur y tibia cortados a nivel de la metáfisis, se obtuvieron las células de médula ósea en el sobrenadante, se colectaron en un tubo Falcon de 50ml para centrifugarse durante 5 minutos a 1500rpm, el botón de células obtenido, fue re suspendido con 1 ml de medio y sembradas en 2 botellas de cultivo unas alimentadas con medio DMEM-alto en glucosa, suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1%, y las otras con medio DMEM-alto en glucosa, suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 1% más ácido ascórbico 50ug /ml, beta glicerol fosfato 10mM y dexametasona 10nM, el cambio de medio se realizó cada tercer día hasta que llegaron a confluencia.

**- Evaluación del fenotipo de células troncales de médula ósea de rata Wistar a través de citometría de flujo**

Las células troncales de médula ósea de rata Wistar una vez llegando a confluencia fueron separadas de la botella con tripsina 0.05% /EDTA 0.02%, para ser teñidas con los anticuerpos anti-CD90, anti-CD44, anti-STRO-1 y

fosfatasa alcalina, posteriormente fueron analizadas en el citómetro FACSCALIBUR ubicado en el Laboratorio Nacional de citometría de flujo, en el instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

- Evaluación de la citotoxicidad del andamio de Gelatina-Ácido Hialurónico con microesferas de quitosán.

Los andamios de Gelatina-Ácido Hialurónico con microesferas de quitosán de 3mm de ancho por 1mm de largo, fueron colocados en cajas de 96 pozos y esterilizados por 30 minutos en luz UV, las células troncales de medula ósea de rata Wistar, fueron sembradas sobre ellos a una densidad de  $5 \times 10^4$  cel/mL por 24h y 4 días, con el kit de vida/muerte (Calceína y Homodímero de Etidio), se preparó la solución de la siguiente manera: en 1 ml de Hanks se le agregó  $1 \mu\text{l}$  de Homodímero de Etidio y  $0.5 \mu\text{l}$  de calceína, esta solución se colocó a los andamios, se dejó incubando durante media hora, pasando el tiempo establecido se retiró y se dio un lavado con Hanks para evitar los residuos y se procedió a hacer la observación en el microscopio de Epifluorescencia, se tomaron imágenes a diferentes aumentos.

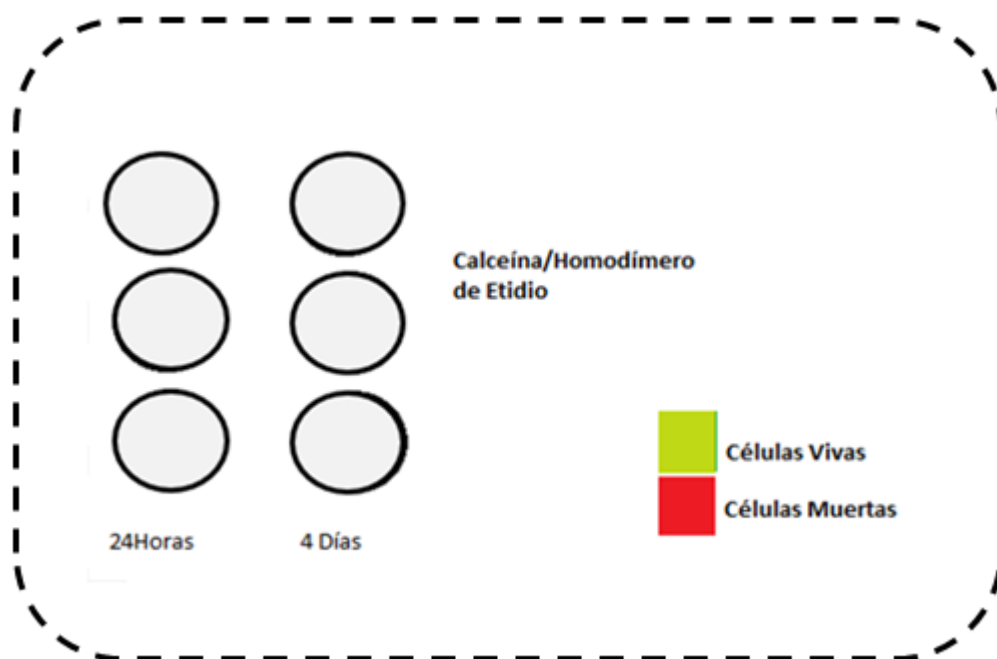


Figura 4. Figura ilustrativa de la prueba de citotoxicidad.

*Evaluación de la presencia de células estromales de Médula ósea de Rata en el andamio de Gelatina-ácido hialurónico con microesferas de Quitosán*

Un cultivo de células estromales de médula ósea de rata Wistar, fueron separadas de las botellas de cultivo con tripsina 0.05% /EDTA 0.02% cuando estas se encontraron en confluencia para ser sembradas en andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con una dimensión de 3mm de diámetro por 1 mm de altura, los andamios fueron previamente esterilizados por luz UV, siguiendo el protocolo de media hora y colocados en cajas de pozos de 48.

Cuando las células se encontraron adheridas a los andamios, a la mitad se les colocó medio alto en glucosa suplementado y a los restantes se les añadió un medio condicionado con ácido ascórbico 50 µg /ml, beta glicerol fosfato 10mM y dexometasona 10nM, se realizó el cambio de medio cada tercer día, los andamios se evaluaron a 7, 15, 22 días.

Al pasar los tiempos establecidos, los andamios fueron lavados y fijados para su procesamiento para tinción histológica

Por último, para todas las gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Microesferas de Quitosán

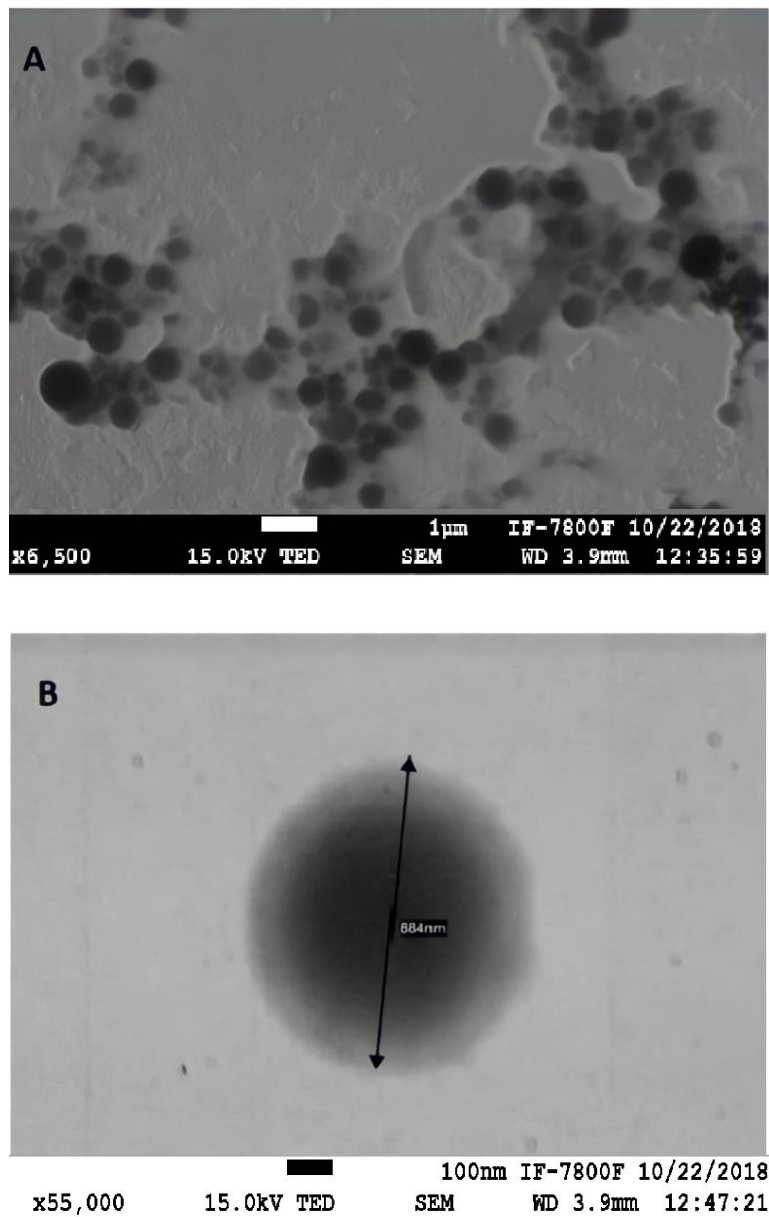


Figura 5. Microesferas de Quitosán 5.A) Conglomerado de microsferas de quitosán 5.B) Una microesfera de quitosán con un diámetro de 884nm.

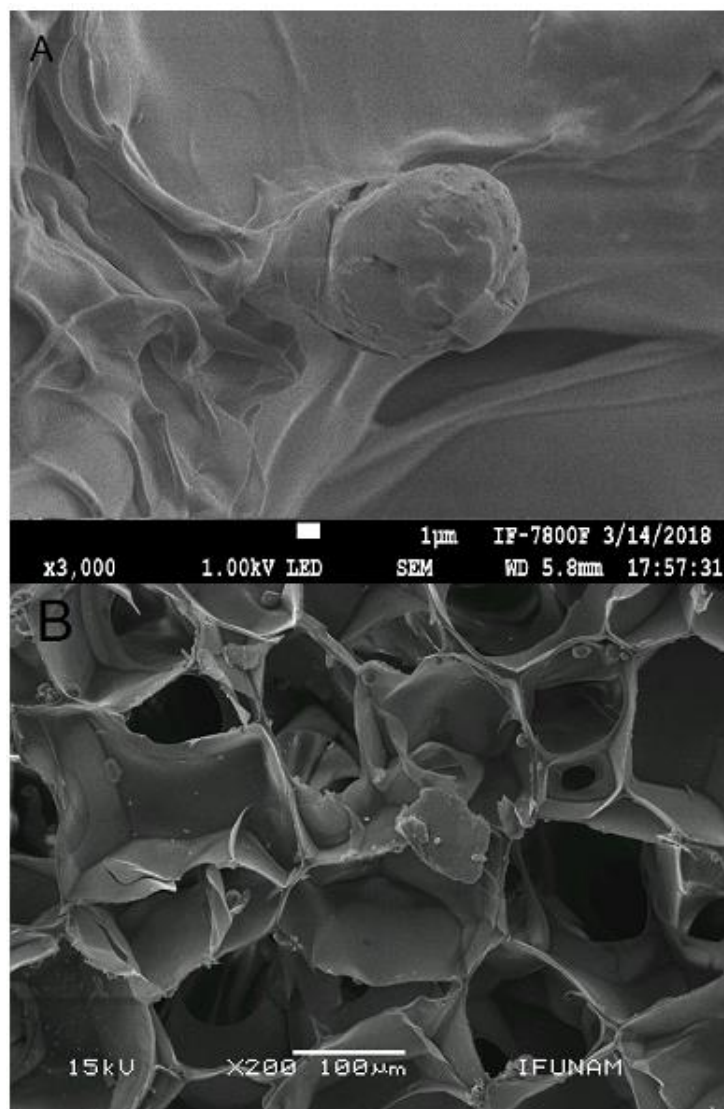
La síntesis de las microesferas de quitosán obtenidas por el método de emulsión simple dio como resultado partículas de quitosán de morfología esféricas con tamaños desde los 200nm a  $1 \times 10^{-6} \mu\text{m}$  como lo muestra la microscopía electrónica de barrido (fig.5A). J. Hou *et al* y Sun Qingsten *et al* en 2012, emplearon el método de emulsión utilizando parafina como medio oleoso para obtener microesferas de quitosán con tamaños que van de 10 a 25 micras, a pesar de que el tamaño fue mayor que el obtenido en este trabajo, la morfología redondeada fue igual en ambos trabajos que la reportada en esta investigación, Por lo tanto, con respecto a la diferencia en tamaños se podría deber al calibre de la aguja empleada para hacer el goteo del quitosán y a la velocidad de las revoluciones por minuto empleadas por el ultraturrax T25 12000rpm, ya que en los anteriores trabajos no usaron agujas para la formación de la gota, emplearon un embudo de separación; además el tiempo que ellos emplearon en vertir la solución acuosa fue de 1ml/min mientras que en este trabajo el tiempo empleado fue de 500 micro litro por minuto. En la figura 5B se puede observar a mayor aumento la microesfera de quitosán de forma esférica y de diámetro de 684nm.

## **7.2 Andamios de Gelatina-Ácido Hialurónico con microesferas de Quitosán**

La figura 6B muestra la morfología porosa del andamio de Ge-AH, obtenidos por el proceso de liofilización, en el interior de la estructura se pueden observar las microesferas de quitosán, que le dan una apariencia rugosa en la superficie donde se localizan; a un mayor aumento del interior del poro, se puede observar como la microesfera de quitosán se encuentra adosada a la pared del andamio conservando su morfología redondeada (fig. 6A). La incorporación de microesferas a los andamios para estimular a las células ya ha sido probado por otros investigadores como Li *et al.* 2015 que incorporaron microesferas a una matriz de hueso bovino descelularizado o J.Hou *et al.* 2012 Que las colocó sobre una esponja de colágeno absorbible, estas investigaciones guardan relación con lo que reporta el presente trabajo ya que en ambos casos el objetivo de emplear las microesferas fue modificar la superficie del andamio para estimular el comportamiento celular, la diferencias que se encuentran en este trabajo con respecto a la investigación

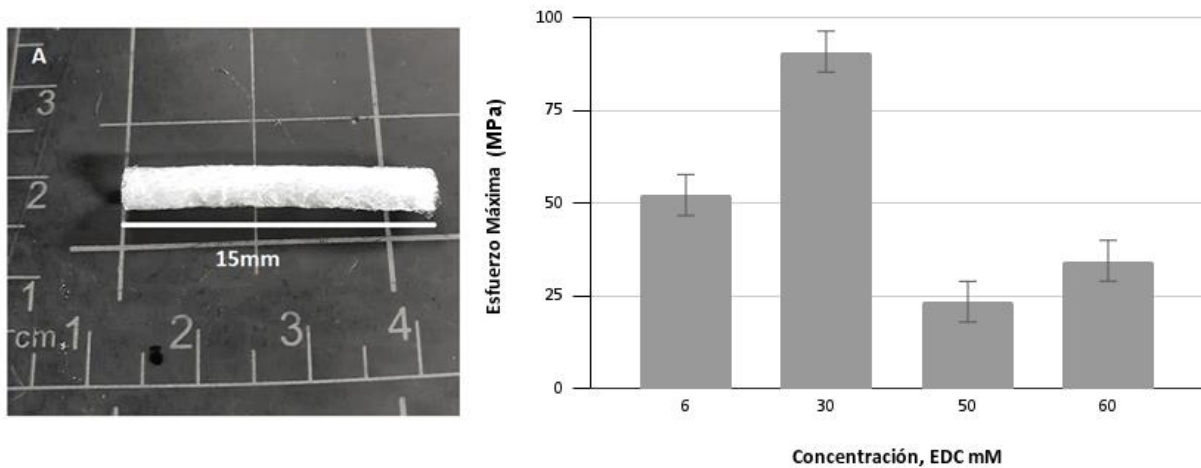


de J.Hou *et al.* 2012 es que ellos sólo colocaron las microesferas dispersas en el andamio sin emplear ningún agente entrecruzante. Por otro lado, Li *et al.* 2015 para la incorporación de las microesferas emplearon el método por presión y tampoco entrecruzaron, en este trabajo se entrecruzó con glutaraldehído durante el proceso de síntesis de las microesferas y posteriormente con EDC al ser colocadas en el andamio, de tal manera que las microesferas están dentro de la construcción del andamio.



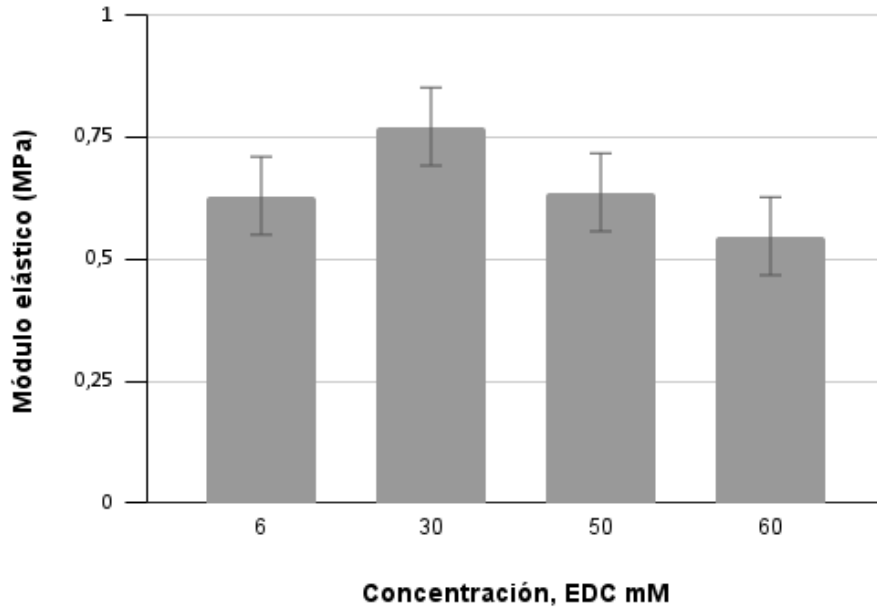
**Figura 6.** Andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán. 6.A) Microesfera de quitosán con mayor aumento dentro del andamio, 6.B) Andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán.

### 7.3 Prueba de tensión



**Figura 7. Prueba de tensión** Figura 3.A Andamio utilizado para la prueba. Figura 3.B Grafica del esfuerzo máximo a la elongación de los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con diferentes concentraciones de EDC.

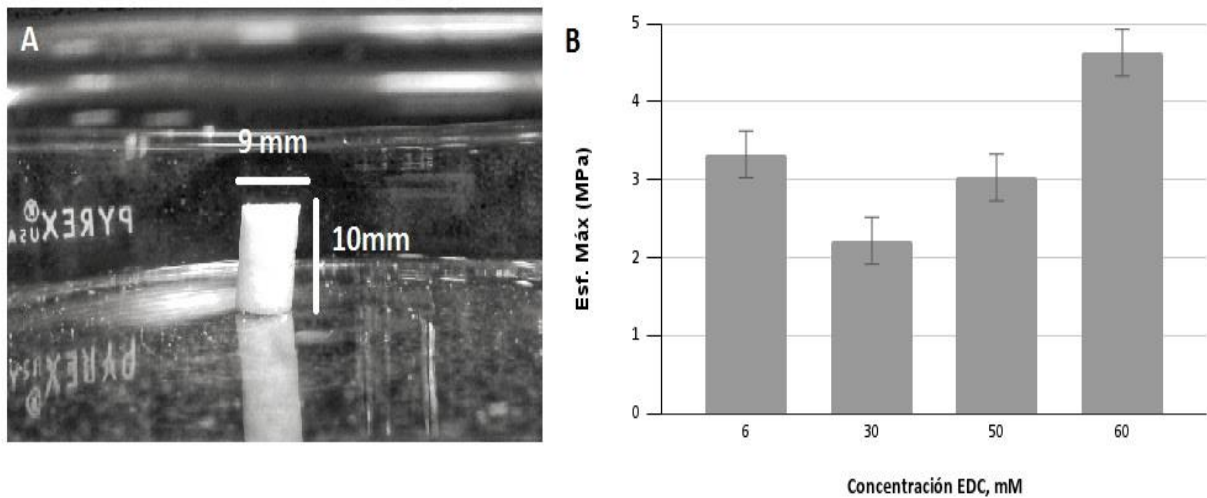
La obtención por el proceso de liofilización de andamios esponjosos de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán como se observa en la figura 7A, fueron de diámetros de 13 a 15mm de largo por 2mm de ancho para la prueba de tensión, en la cual se determinó la capacidad de elongación (fig.7B) y el módulo elástico de los andamios a diferentes concentraciones del agente reticulado (Fig. 8). En la figura 7B se grafica el esfuerzo máximo necesario para fracturar el material en tensión de las diferentes concentraciones de EDC 6, 30, 50 y 60mM. Se encontró que el andamio entrecruzado con 30mM obtuvo el esfuerzo máximo (casi 100 MPa), lo que indica que tiene un comportamiento plástico, es decir, que puede ser estirado y no fracturarse, aunque la carga sea elevada (100 MPa). El andamio de 50mM apenas soportó una carga de 20 MPa, antes de fracturarse, con respecto al andamio de 60mM se encontró una menor elasticidad y las rupturas se pudieron observar desde el inicio de la prueba, con estos resultados en conjunto se puede indicar que a mayor cantidad de entrecruzante, el material se vuelve más rígido. Por lo tanto, es un material frágil, lo que ocasiona más fracturas (rupturas).



**Figura 8. Módulo Elástico de los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con diferentes concentraciones de EDC**

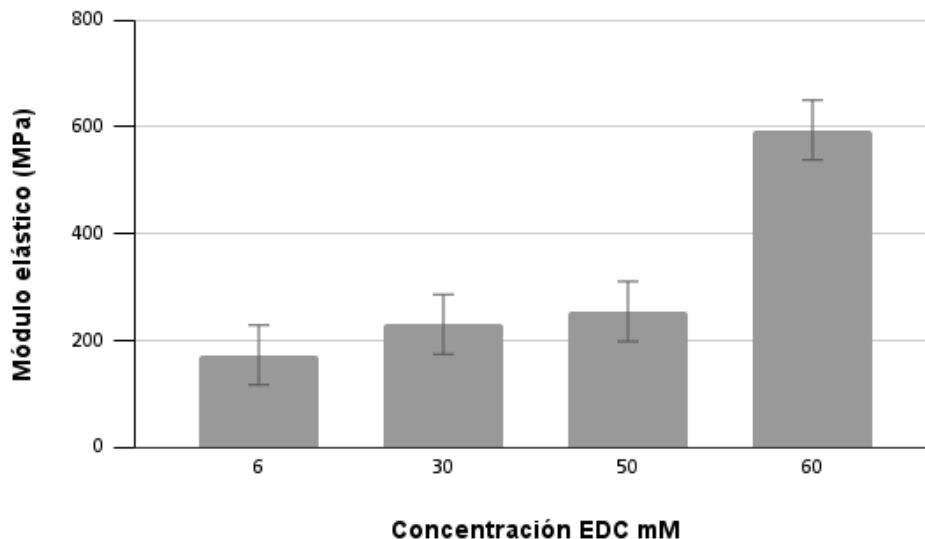
La figura 8 nos muestra el módulo elástico calculado a partir de la prueba de tensión lo cual indica que la concentración de 30mM tiene un mayor módulo elástico (0.7-0.8 MPa) encontrando una diferencia significativa con respecto a las concentraciones de 6, 50 y 60mM.

## 7.4 Prueba de compresión



**Figura 9.** Figura 9.A Imagen del andamio antes de la prueba. Figura 9.B. Esfuerzo maximo a la compresion de los andamios de gelatina-cido hialurnico con microesferas de quitosn con diferentes concentraciones de EDC

La compresion est definida como el cambio dimensional en altura, del material al aplicar una fuerza en sentido vertical. En la figura 9.A podemos observar los andamios de 10mm de largo por 9mm de ancho que se emplearon para la prueba de compresion, en la figura 9.B se muestra la grfica del valor de la carga mxima en MPa respecto a la formulacion de los andamios entrecruzados con EDC (6, 30, 50 y 60mM. Los resultados indicaron que la concentracion de 30 mM necesit en promedio menos fuerza aplicada en direccion vertical que las otras concentraciones, lo cual se traduce en menor esfuerzo en MPa, mientras que la concentracion de 60mM tuvo un mayor esfuerzo, 4.5 MPa aproximadamente, siendo significativamente diferente.



**Figura 10. Modulo elástico (compresión) de andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de Quitosán a diferentes concentraciones de EDC**

En la figura 10 se muestra que el andamio a concentración 60mM tiene el mayor módulo elástico en la prueba de compresión y el 6mM tiene el menor, encontrando que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 30 y 50mM.

Los andamios de gelatina-ácido hialurónico después de ser entrecruzados y liofilizados mostraron un rígido visiblemente entre todos grupos, al ser sometido a las diferentes pruebas mecánicas se demostró que la tensión, elasticidad se correlacionaban con la concentración de EDC empleada. En cuanto a la tensión, el andamio de 30mM mostró una mayor capacidad de elongamiento casi 100 MPa, mientras que en 60Mm encontramos 20 MPa, otros investigadores han evaluado el comportamiento mecánico de sus biomateriales y los resultados han sido inferiores a los obtenidos en el presente trabajo, Banerjee, *et al.*, en 2009, fabricó un andamio de gelatina con microesferas de PGLA y este, fue sometido a pruebas de tensión donde el andamio que soporto más elongación llego solamente a 0,448 MPa y el menor a 0,280 MPa., ellos no mencionaron si el andamio que fabricaron era para hueso cortical o hueso esponjoso, esto es importante debido a que, las cifras establecidas en la Tabla 2 indica que carga puede llegar a soportar el

tejido óseo en regiones como: el hueso cortical puede llegar a soportar hasta 150 MPa, y el trabecular tan solo 8 MPa, nuestro trabajo se encuentra dentro de estos parámetros.

Por otro lado, en las pruebas de compresión, Maji y su equipo en el 2015 mostraron que sus andamios de gelatina-quitosán-nanoglass al ser sometidos a pruebas de compresión a través de una máquina de pruebas universales, muy similar a la empleada en este estudio, obtuvieron en los andamios compuesto solo con gelatina y quitosán, sin incluir el nanoglass, presentó un módulo elástico de  $50 \pm 5.23$  MPa con  $0.8 \pm 0.16$  MPa, resultados que se correlacionan con los nuestros en la concentración de 50mM, en su estudio estas cifras aumentaban a medida que le agregaban en diferentes concentraciones el biovidrio/nanoglass obteniendo el máximo módulo elástico, el cual fue de  $111 \pm 12.09$  con carga de  $2.2 \pm 0.02$  MPa el empleo de otros biomateriales como las cerámicas, en la fabricación de un andamio a base de materiales poliméricos mejora las propiedades mecánicas, como lo mostró Maji *et al* 2015, en contraste, en la presente investigación se empleó el agente entrecruzante EDC para mejorar la mecánica del andamio, a mayor concentración de EDC se encontró un módulo elástico más alto, igual que la carga máxima, siendo los andamios más rígidos y con una mayor resistencia a la compresión.

## 7.5 Degradación *in vitro*

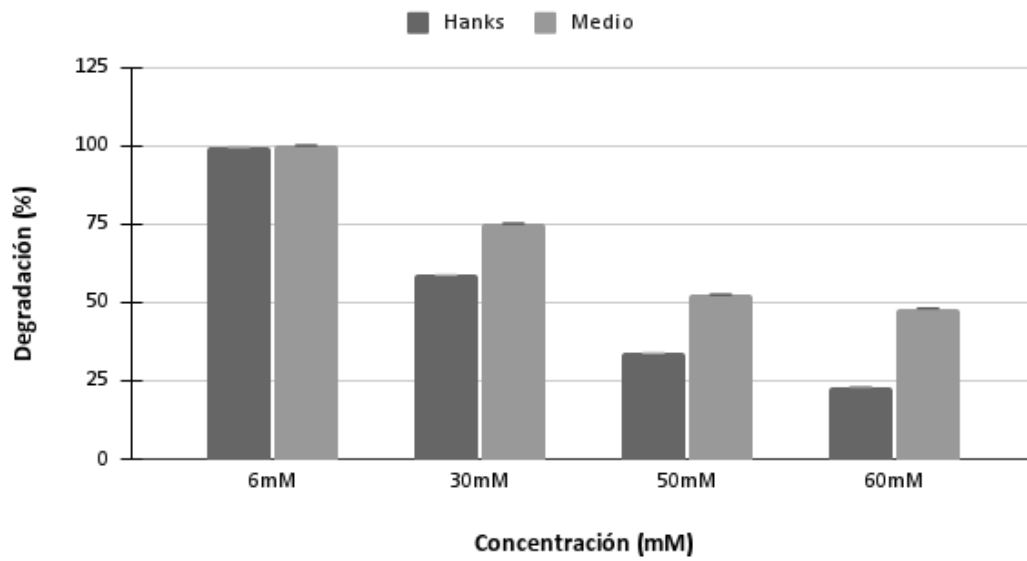


Figura 11. Degradación *in vitro* del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a 14 días.

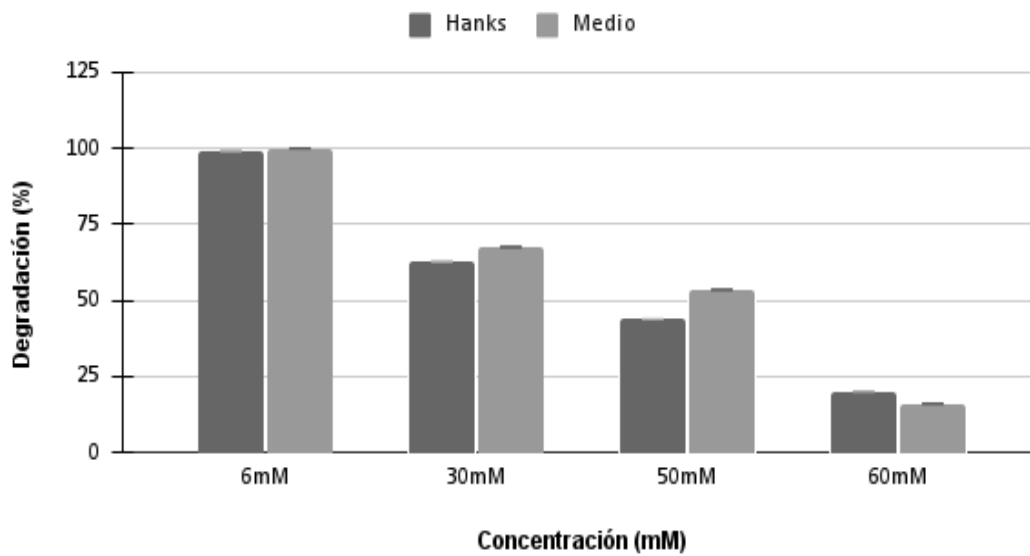
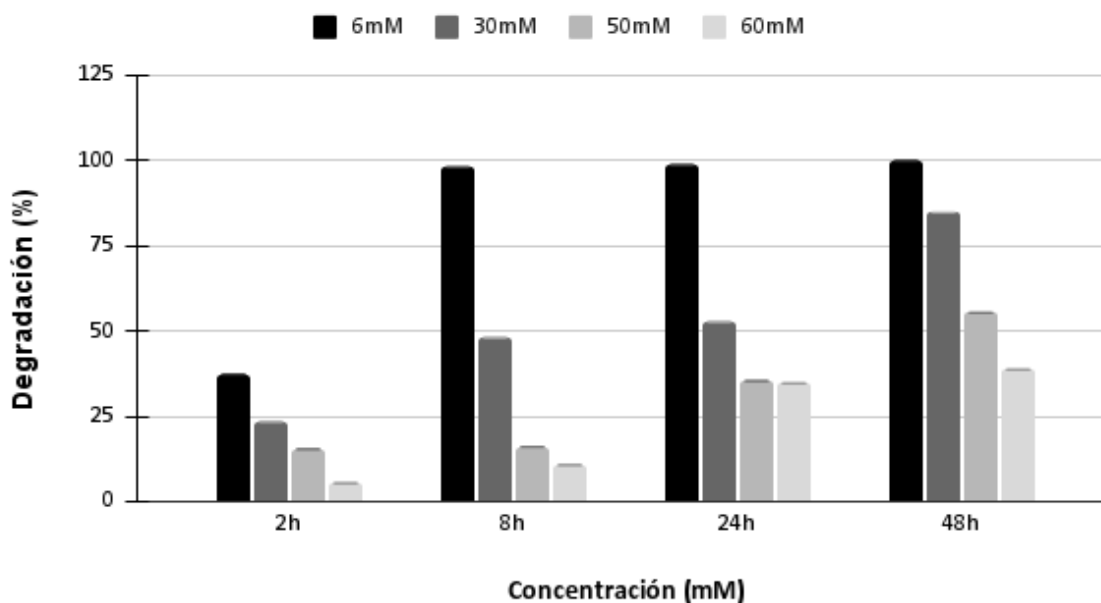


Figura 12. Degradación *in vitro* del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a 22 días.

En la prueba de degradación *in vitro* de los andamios con las 4 concentraciones de EDC, donde cada andamio fue pesado a 0.050gr con la finalidad de estandarizar todas las condiciones experimentales. Los resultados se pueden observar en la figura 10, en el cual se muestra que, al incrementar la concentración de EDC como agente entrecruzante en el andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesfera de quitosán hubo una menor degradación del andamio tanto en condiciones de cultivo con buffer así como en el medio de cultivo encontrando que no hubo diferencia significativa entre ellos en el tiempo de degradación de 14 días (fig. 11) mientras que a los 22 días se encontró diferencia significativa entre medio de cultivo y el buffer en las concentraciones de 50 y 60mM (fig. 12), Con respecto al porcentaje de degradación de las diferentes concentraciones de EDC, se reporta que sí hay diferencia significativa entre la concentración de 6mM, con 30, 50 y 60mM, lo que indica que 6mM tiene mayor porcentaje de degradación seguido por 30mM que también muestra diferencia significativa con 50 y 60mM, finalmente no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de 50 y 60mM a los 14 días (fig. 11). Los resultados obtenidos del porcentaje de degradación a los 22 días, se encontró que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 50 y 60mM, pero sí con respecto a 6 y 30mM, esto indica que el entrecruzamiento retrasa el proceso de degradación.





**Figura 13. Degradación in vitro del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con collagenasa tipo I.**

La collagenasa es una enzima cuya función es degradar la matriz extracelular, debido a que los andamios están formados por gelatina y ésta proviene de la hidrólisis parcial de la colágena, son fácilmente por acción de esta enzima degradados, la figura 13 muestra las diferentes concentraciones de EDC a distintos tiempos; a las 2 h no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de 30 y 50mM de EDC, teniendo un 35 a 40% de degradación, mientras que a las 8h 6mM tiene un 95% de degradación mientras que 50 y 60mM no muestran diferencia significativa al tener entre 30 a 35% de degradación, a las 24h se encontró diferencia significativa entre las 4 concentraciones, 6mM se degradó completamente, 30mM un 60%, 50mM con 50% y 60mM con 40% de degradación. A las 48h 30mM tuvo un 90% de degradación y 50mM un 80%, siendo 60mM la concentración que más resistió la degradación con collagenasa al tener un 60% de degradación.

El tiempo de degradación de un andamio es importante para permitir el depósito de matriz por parte de las células, por lo tanto, se desea una degradación lenta y controlada. Maji, *et al.*, en el 2015 evaluó en sus andamios de gelatina-quitosán-nanoglass el tiempo de degradación, sumergiéndolos en PBS durante 14 días, sus resultados mostraron un 30%

de degradación, esto coinciden con el porcentaje encontrado en nuestro estudio que corresponde a los andamios entrecruzados con 50 y 60mM de EDC a 14 días, para ellos la inclusión de nanoglass o biovidrio funciona como reticulante, ya que actúa a través de puente de hidrogeno e interacción iónica con las moléculas de agua debilitando la interacción del agua-gelatina, evitando la degradación de esta molécula, en nuestro andamio de gelatina-ácido hialurónico, el EDC como entrecruzante es pieza clave para la estabilidad de los polímeros, así los andamios con mayor reticulante fueron los menos degradados.

Por otro lado, las metaloproteasas de matriz (MMP) como la colagenasa tipo I ha sido empleada en estudios *in vitro* para evaluar el tiempo de degradación de los andamios, como lo hicieron Geunseon *et al.*, 2013, en sus andamios de gelatina reticulados con glutaraldehído, ellos reportaron que al disminuir la concentración de gelatina aumentó el tiempo de degradación del andamio, estos andamios fueron evaluados hasta los 7 días sumergidos en colagenasa pero desde el primer día detectaron degradación en gran porcentaje, en relación a los resultados obtenidos en esta investigación coincide en que desde las 2 h se pudo apreciar una degradación en los andamios en especial, en aquellos que cuentan con una menor concentración del reticulante, otro punto importante a destacar es que ellos pusieron andamios de mayor tamaño.

Finalmente, con todos los resultados obtenidos en el test de mecánica y de degradación *in vitro* indican, que la concentración de 50 y 60mM son andamios que resisten la degradación porque están más entrecruzados y son biomateriales que al someterlos a una fuerza son más rígidos y de acuerdo a su módulo de Young son elásticos, al no encontrar diferencia significativa entre ambas concentraciones, se decidió para las demás pruebas de caracterización física y biológica sólo usar la concentración de 50mM.

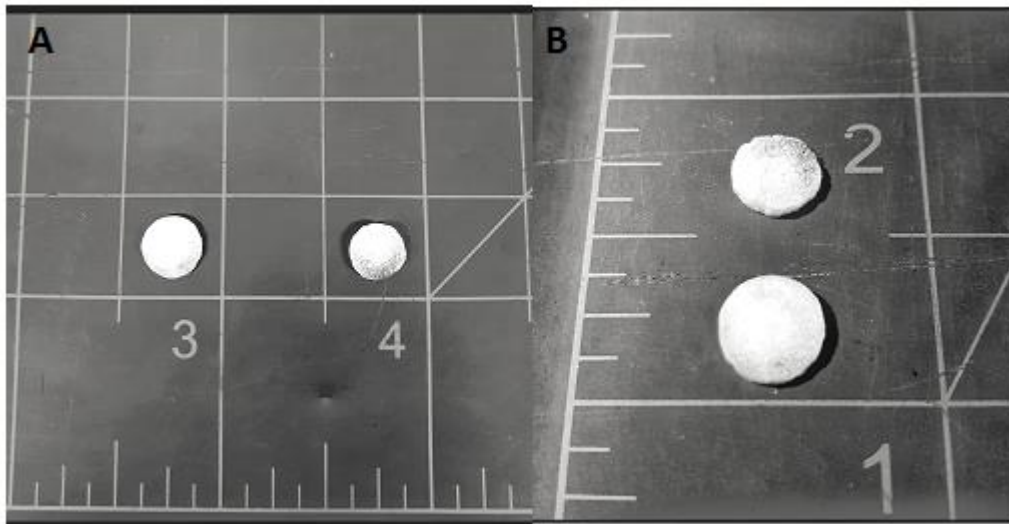


Figura 14. Andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán

### 7.6 Diámetro y profundidad del poro

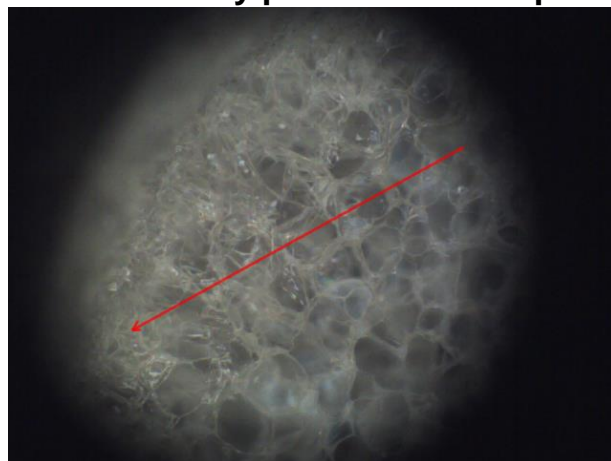


Figura 15. Tomografía OCT del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán, se muestra el área donde se realizó el corte para la tomografía (Flecha roja)

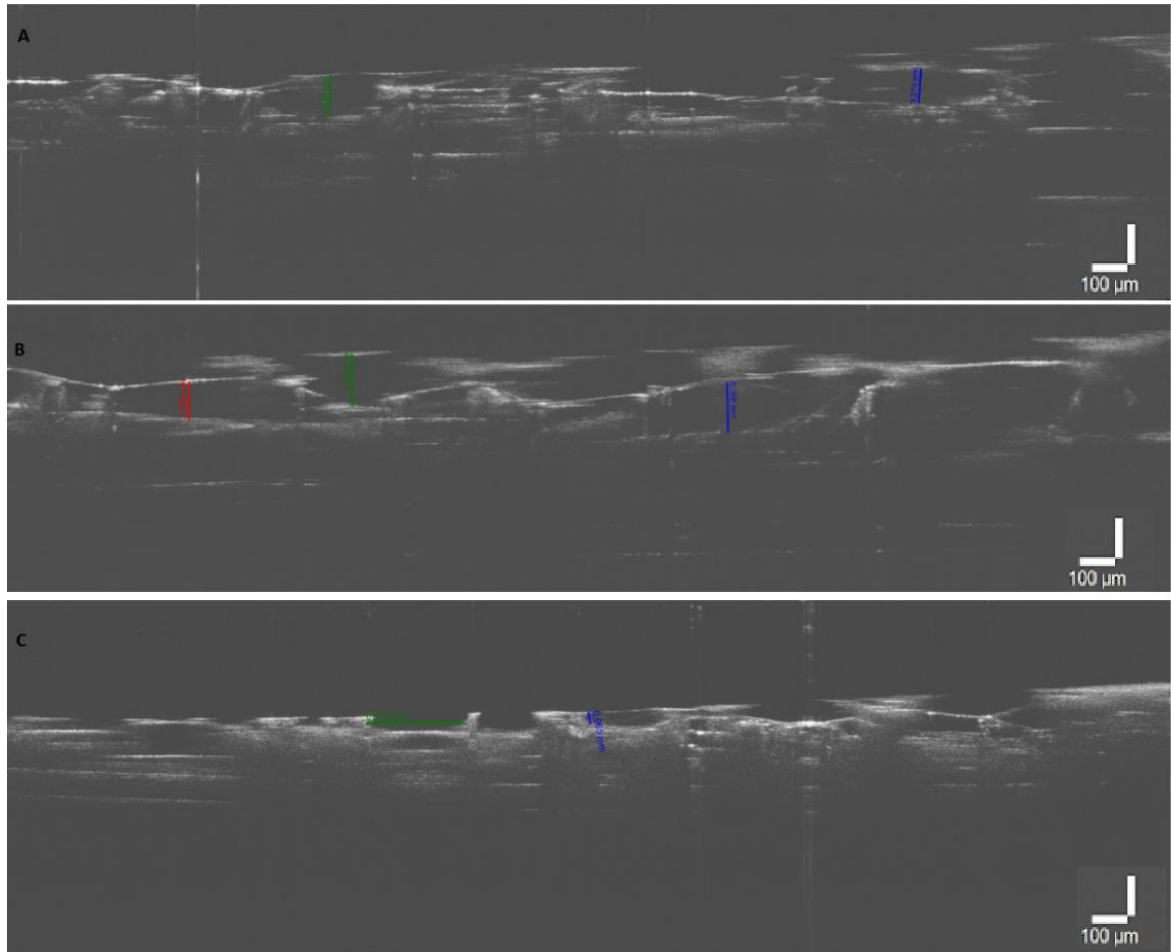
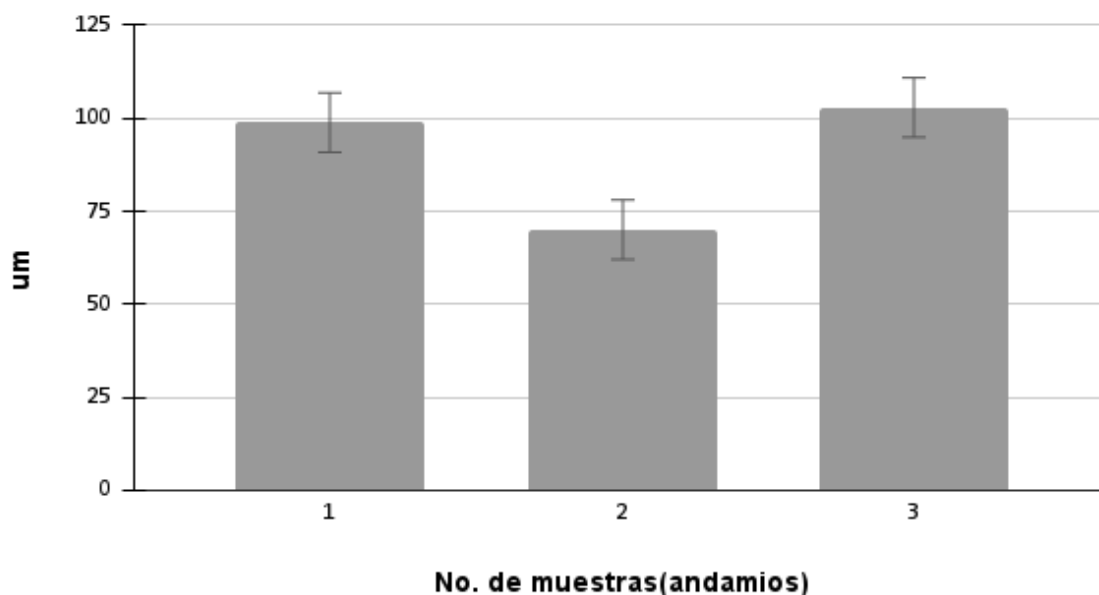


Figura 16. Diámetro de los poros del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán A y B) Valores de profundidad de poros del andamio en de dos tomografías diferentes. C) Valor de diámetro y profundidad de un poro.



**Figura 17. Gráfica del diámetro del poro de andamios de gelatina- ácido hialurónico con microesferas de quitosán.**

Para el diámetro de poro se utilizó una N de 3 muestras y por cada muestra se cuantificó una N de 74 poros.

Para la caracterización física y biológica de los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán entrecruzado con 50mM de EDC, se obtuvieron andamios de diámetro de 9mm y grosor de 2mm (Fig. 14).

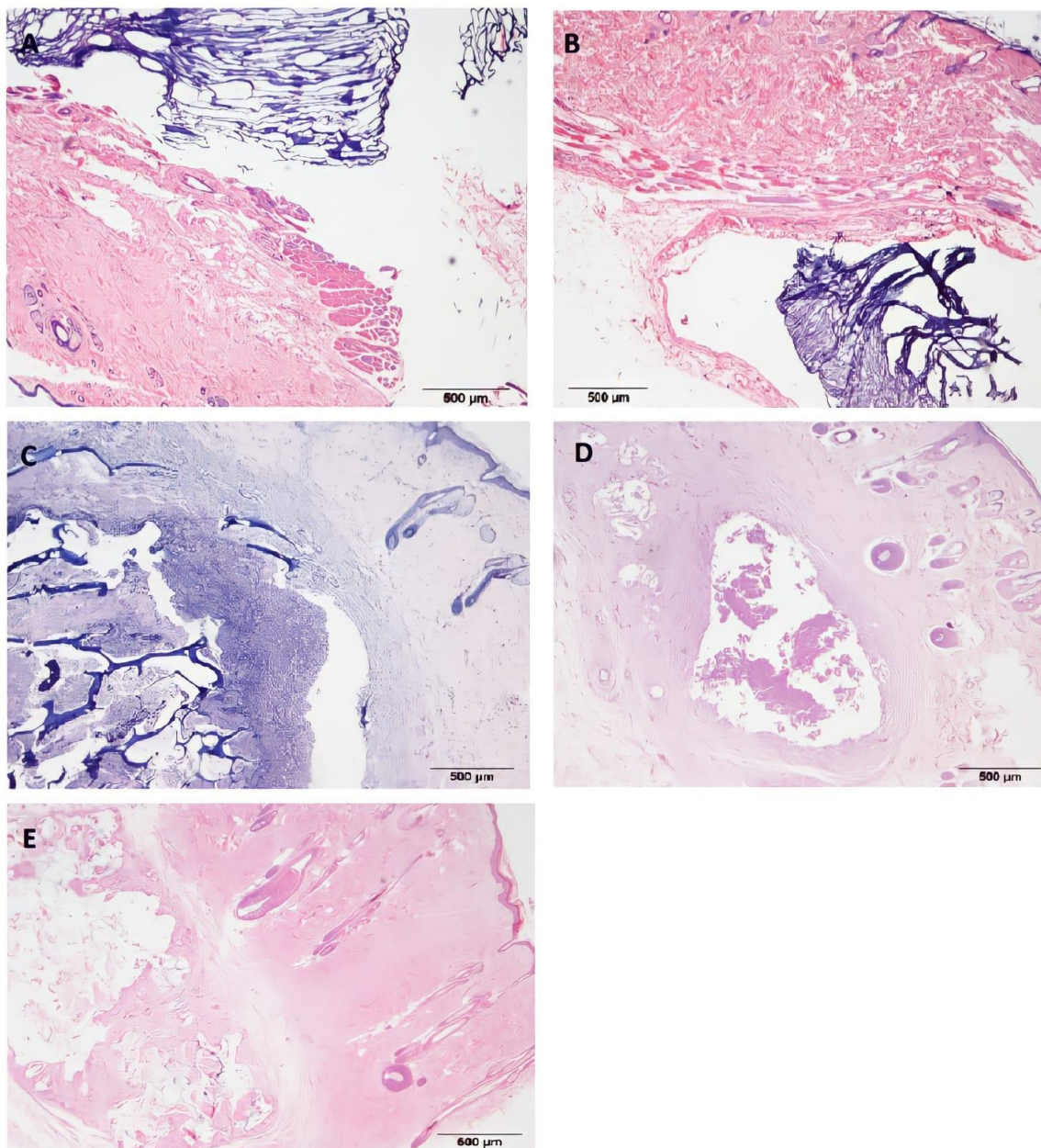
Con la tomografía se obtuvieron valores de profundidad y diámetro de poros de un andamio de gelatina-ácido hialurónico (fig. 15) donde a través de un microscopio estereoscópico se ve su estructura porosa y se señala con una flecha roja el área evaluada. En este estudio se encontró que la profundidad de poro en promedio fue de 0.240mm, que equivale a  $240 \times 10^{-6} \mu\text{m}$  (fig.16).

La porosidad de un andamio brinda mayor área superficial para la adhesión de las células, además de permitir la migración y comunicación celular, el diámetro de los poros del andamio de gelatina-ácido hialurónico entrecruzado con 50mM de EDC se a través del procesamiento de imágenes de microscopía electrónica de barrido de dicho andamio en el programa de Imagen Propulse, se determinó que el diámetro del poro de la muestra van desde 70- 102µm(fig. 17), lo cual es favorable para la adhesión, migración y

comunicación celular, según lo demostrado por Askarzaden *et al.*, 2004, que a través del método de “solvent casting” fabricó un andamio de gelatina e hidroxiapatita, cuya porosidad era de 50-200µm, los poros eran ovalados y con una buena interconectividad. El tamaño del poro es importante, los poros grandes, es decir, entre 100 y 500µm, ayudan a la proliferación celular, facilitan la mejor y rápida integración del tejido recién formado, vascularización y bioreabsorción.

Barnejee *et al.*, en el 2009, realizaron a través del método de liofilización, un andamio de gelatina con microesferas de PGLA, reticulado con glutaraldehído, las microesferas empleadas para este andamio fueron elaboradas por el método de emulsión-evaporación del solvente. Todos sus andamios contenían de 25 al 45% de poros, sus resultados indicaron que los andamios con el 10% de microesferas de PGLA tenían una menor cantidad de poros, mientras que en los andamios con 0.1% de microesferas tuvo mayor cantidad de poros. En el presente trabajo también se empleó el proceso de liofilización para la obtención de los andamios porosos que favorecen la interconectividad que posteriormente ayudaría a la migración celular con la formación de canales donde las células se pueden mover o adherirse formando así la matriz extracelular del tejido, también la técnica de emulsión para elaborar las microesferas, fue común en ambos trabajos, ellos reportaron que la incorporación al 0.1 y 1% de microesferas de PGLA, mejoro la porosidad del andamio, en este trabajo la porosidad está relacionada con la mayor concentración de EDC, el tamaño de las microesferas que fueron menores a un micrómetro, no interfirieron en la interconectividad y porosidad de nuestros andamios.

## 7.7 Degradación *In vivo*



**Figura 18. Degradación *in vivo* del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de Quitosán** A) Andamio de Ge-HA con microesferas de Quitosán, 1 h. B) Andamio de Ge-HA con microesferas de Quitosán, 6 h. C) Andamio de Ge-HA con microesferas de Quitosán, 7 días. D) Andamio de Ge-HA con microesferas de Quitosán, 15 días. E) Andamio de Ge-HA con microesferas de Quitosán, 30 días

La evaluación de la degradación *in vivo* de los andamios de Ge-AH con microesferas de quitosán colocados subdérmicamente en ratas albinas de la cepa Wistar (fig.18), dio como resultado que el andamio a la hora posterior a su colocación se encontraba íntegro y no había indicios de proceso de degradación ni de respuesta inmunológica (fig.18A). Sin embargo, a las 6 h posteriores a la implantación, el proceso inflamatorio comenzó a observarse

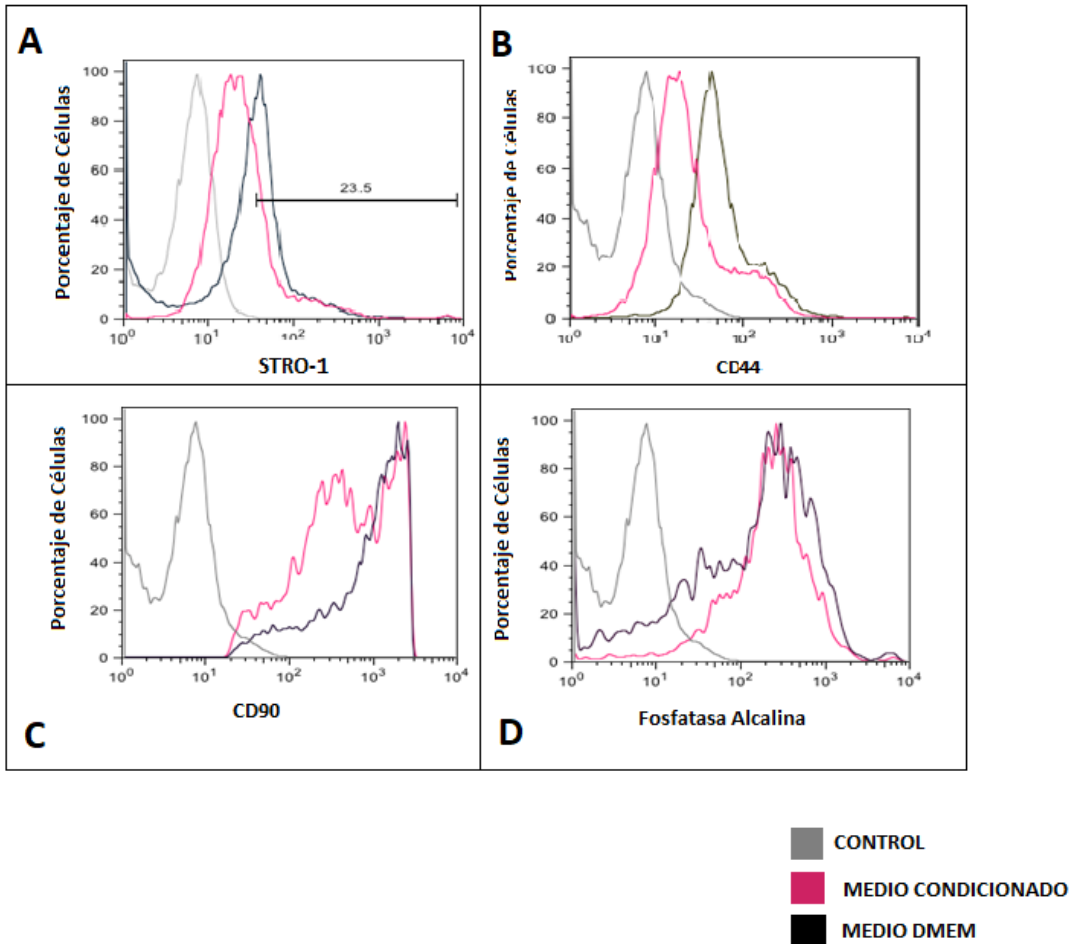
con escaso infiltrado inflamatorio (fig.18B) para los 7 días posteriores al implante, el andamio se encontraba en menor proporción (fig. 18C) con respecto a los andamios de la figura 18A y B, que corresponden a la hora y seis horas de implantado el andamio, además se puede observar una respuesta inflamatoria de fase aguda mediada principalmente por neutrófilos (fig. 18C) para los quince días la cantidad del material del andamio es escaso (fig.18D) y tampoco hay infiltrado inflamatorio, hubo presencia de macrófagos, lo cual significa que está siendo degradado por el organismo, ya para los 30 días es casi nula la presencia del andamio (fig. 18E), por lo que el andamio fue reabsorbido de manera natural, sin mostrar ninguna complicación como una reacción a cuerpo extraño que lleve a la presencia de tejido de granulación.

Los andamios que son utilizados en la ingeniería de tejidos, tienen un objetivo final, el cual es la implantación de estos en el cuerpo humano para poder producir la reparación del tejido afectado, para implantar un andamio se necesita comprobar que cumpla con tres propiedades importantes (Osteogénesis, osteoinducción, osteoconducción) para poder tener una mejor integración.

Singh, *et al.*, en 2014, evaluó la degradación *in vivo* de un andamio liofilizado de gelatina-ácido hialurónico-alginato entrecruzado con  $\text{CaCl}_2$ , colocado en la región subcutánea a tiempos de 1 h, 1 día y 7 días, las evaluaciones realizadas en esta investigación fueron a los 7, 14 y 30 días, mientras que Azami, *et al.*, en 2011 evaluó bajo el mismo procedimiento un andamio poroso de gelatinae hidroxiapatita (60:40) dejándolo hasta por 8 semanas en el ratón, en los cortes histológicos se mostró poca evidencia de andamio al mes.



## 7.8 Evaluación del fenotipo de células troncales a través de citometría de flujo

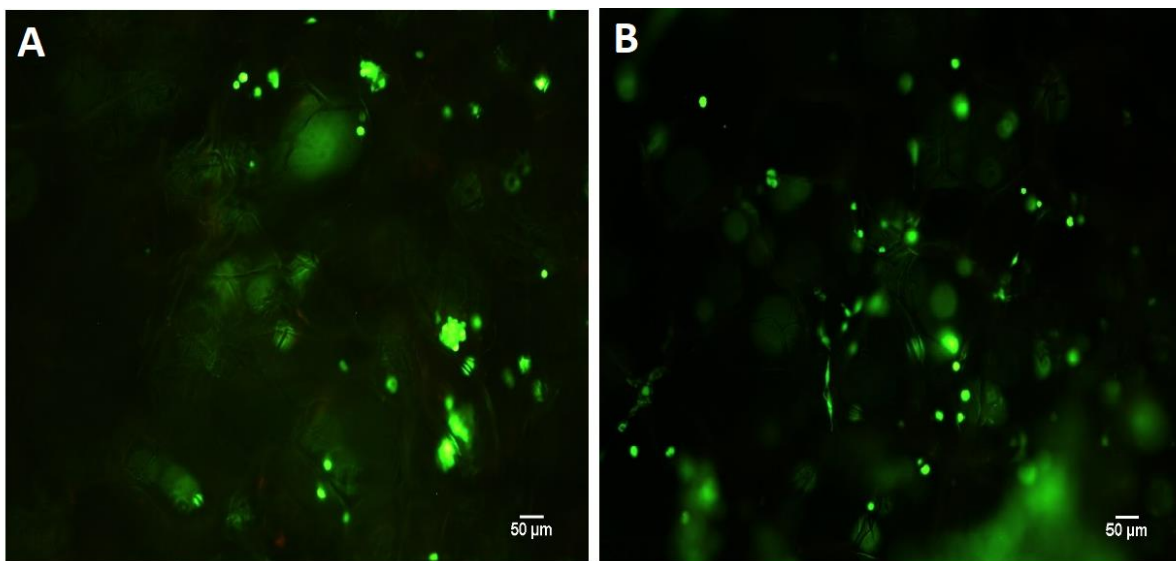


**Figura 19. Citometría de flujo del fenotipo de las células troncales de médula ósea de rata A) STRO1 11.B) CD44 11.C) CD90 11.D) Fosfatasa Alcalina**

La evaluación biológica del andamio requirió de la obtención de células estromales de médula ósea de rata, a las cuales se les evaluó el fenotipo a través de citometría de flujo, con tres marcadores de células madre (CD90, CD44, STRO-1) y un marcador de tejido óseo (Fosfatasa Alcalina), estas células fueron expandidas con dos medios diferentes (DMEM y uno condicionado), en la figura 15 se puede observar el histograma de los cuatro marcadores, para STRO-1 (fig. 19A) y CD44 (fig. 19B) las células cultivadas con el medio de DMEM son positivas para estos marcadores, en CD90 (fig.

19C) el comportamiento de las células es igual sin importar el medio de cultivo, mientras que para Fosfatasa alcalina (fig. 19D) las células condicionadas fueron positivas. Esto indica que el medio condicionante diferencia a las células estromales de médula ósea a hueso, además con este experimento pudimos definir que el porcentaje de células troncales de médula ósea que se obtuvo a partir del método de perfusión de los huesos fémur y tibia de la rata Wistar fue del 1% posterior a 14 días de cultivo

### 7.9 Ensayo de citotoxicidad

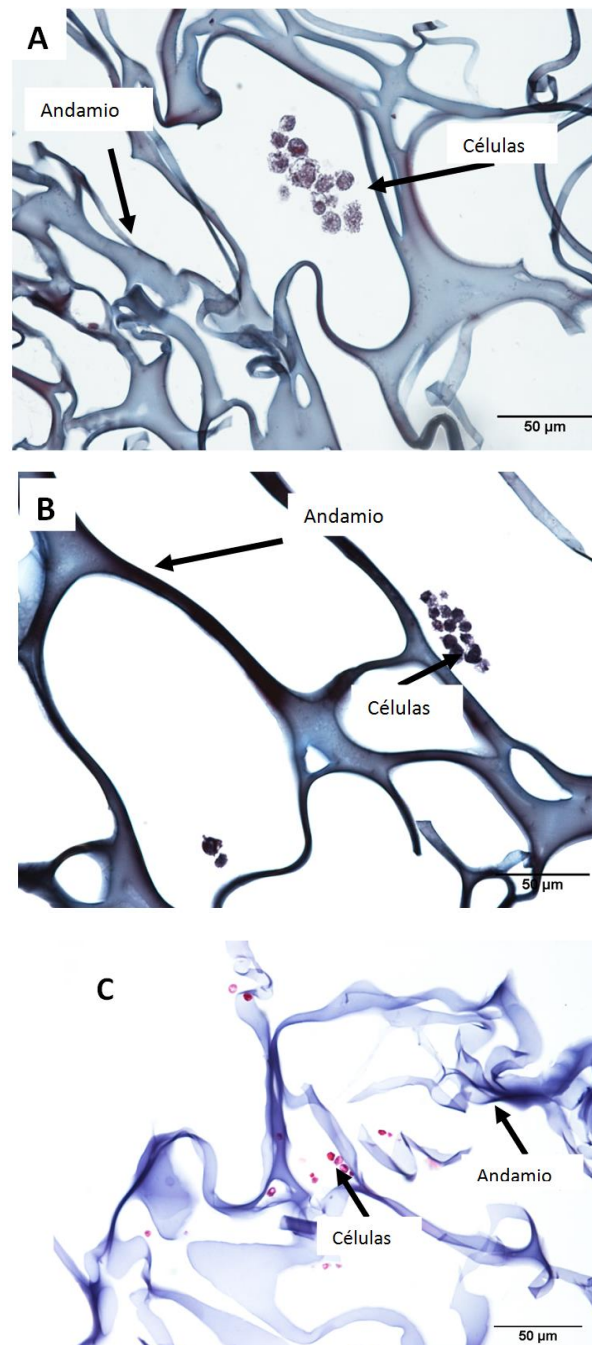


**Figura 20. Citotoxicidad del andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán a 24 horas y 4 días. A) 24 horas B) 4 días**

La figura 19 muestra a las células estromales de médula ósea de rata Wistar sembradas sobre los andamios de Gelatina- Ácido Hialurónico con microesferas de quitosán a 24 h (fig. 20A) y 4 días (fig. 20B), las cuales fueron teñidas con calceína y homodímero de Etidio donde las células vivas se tiñeron de verde (positivas a calceína) y las células muertas se tiñen de color rojo (positivas a homodímero de Etidio). A las 24h se observó que todas las células fueron positivas a calceína teniendo una morfología redondeada, con respecto a los 4 días se puede observar que las células también son positivas a calceína y las células comienzan a alargarse, además de que la población fue mayor que a las 24h, lo cual indica que las

células no solo están adheridas al andamio, sino que a través de los días estuvieron proliferando. Resultados similares reportaron Kao et al., 2019, cuyos andamios de gelatina y gelatina con ácido hialurónico, mostraron gran viabilidad celular a los 3 y 7 días y muy pocas o ninguna células muertas, esto demuestra que el andamio puede promover la proliferación celular y que los materiales, empleados en ambos trabajos no son tóxico para células mesotealiales y células de médula ósea.

### 7.10 Presencia de células estromales de Médula ósea de Rata en el andamio de Ge-HA con microesferas de Quitosán



**Figura 21.** Presencia de células estromales en los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de Quitosán. A) Control medio DMEM B) Medio mineralizante a 7 días C) Medio mineralizante a 15 días.

El cultivo de las células estromales de médula ósea sobre los andamios fue mantenido hasta 7 y 14 días (fig.21A y B). Se puede observar la presencia de células sobre el andamio a través de la fotomicrografía teñida con H&E

(figura 21). Este experimento se realizó con la finalidad de mostrar la biocompatibilidad del andamio con células de médula ósea obtenidas de rata Wistar, que se quedaron adheridas en los poros del andamio de Gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán, y se pueden observar hasta los 14 días en la superficie del andamio, con una morfología redondeada. También se pueden sembrar diferentes linajes celulares, por ejemplo, líneas celulares o células mesenquimales. Diferentes investigadores como Askarzadeh et al 2009 y Sharma et al. 2016, han empleados líneas celulares para hacer pruebas de viabilidad y adhesión celular mientras que Maji, et al., 2015 y nosotros empleamos MSC. La morfología de las células al principio fue redondeada y pasaron a ser fusiforme conforme transcurrían los días, observando que a los 5 días las células adquirirían una apariencia aplanada sobre la superficie y dentro del andamio.

## **8. CONCLUSIONES**

La ingeniería de tejidos es una rama de la medicina regenerativa que tiene como objetivo principal, la reparación y sustitución de tejidos que han sido afectados por diferentes factores, la ingeniería de tejidos óseos es un gran desafío para la actualidad. En este trabajo se construyó un andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán reticulado a diferentes concentraciones mili molares (6, 30, 50,60mM). Se realizó la caracterización física, a través de microscopía electrónica de barrido donde se observó la morfología esférica de las microesferas con un rango de tamaño de 200nm-1x 10<sup>-6</sup>µm y la morfología del andamio ya con las microesferas añadidas, el tamaño de poro va desde 70-102µm

En cuestión de la caracterización mecánica, pruebas de tensión y compresión, la degradación in vitro fue de suma importancia para tomar la decisión de tomar el andamio 50mM para la caracterización biológica ya con los resultados preliminares de los otros ensayos.

El andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán resultó no ser toxico para cultivos de células estromales de médula ósea, y las células adquieren una morfología esférica al quedarse en el andamio.

La degradación *in vivo* comienza desde los 7 días de estar en el organismo, en la rata Wistar y termina de degradarse a los 30 días de la implantación.

Con los resultados de la caracterización, el andamio muestra un comportamiento adecuado para la posible diferenciación de células estromales a osteoblastos y la posible regeneración ósea a través de pruebas *in vivo*.

## 9. PERSPECTIVAS

Para poder complementar este proyecto, los posibles puntos a realizar son los siguientes:

- La evaluación de la liberación de los factores BMP-2 Y VEFG de las microesferas de quitosán en el andamio de Gelatina-ácido hialurónico.
- La evaluación de la proliferación y diferenciación de células de rata Wistar y células de cordón umbilical de humano, sembradas en el andamio de Gelatina-ácido hialurónico con las microesferas de quitosán con factores de BMP-2 y VEFG.
- La creación de defectos en calotas en Ratas Wistar, sacrificio de los organismos a los 3,6,12 meses y análisis de las muestras histológicas

## 10. APÉNDICE A.

Para la caracterización mecánica del andamio de gelatina-ácido hialurónico con esferas de quitosán, se realizaron pruebas de compresión y tensión al hacer estas pruebas el andamio se tomó como un material sólido y los resultados reportados anteriormente corresponden a un material de este tipo. Se realizaron pruebas bajo la misma condición pero reportando el andamio como un material poroso, tomando en cuenta el área efectiva para el modulo elástico y el esfuerzo máximo (Figura 22 y 23) en ambas pruebas, los resultados arrojados muestran que se subestima un 15 a 20% las propiedades mecánicas del andamio.

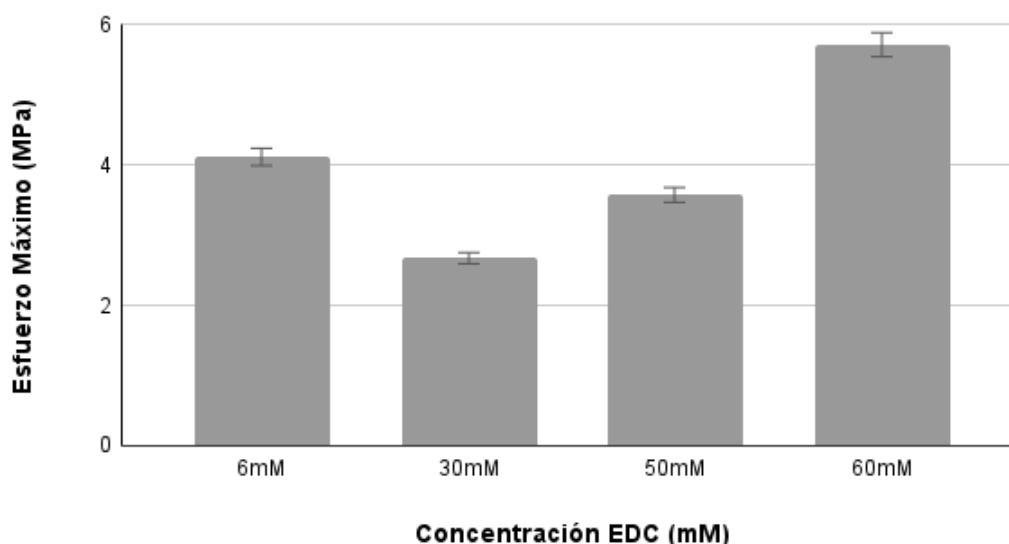


Figura 22. Esfuerzo máximo a la compresión de los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con diferentes concentraciones de EDC con el área efectivo



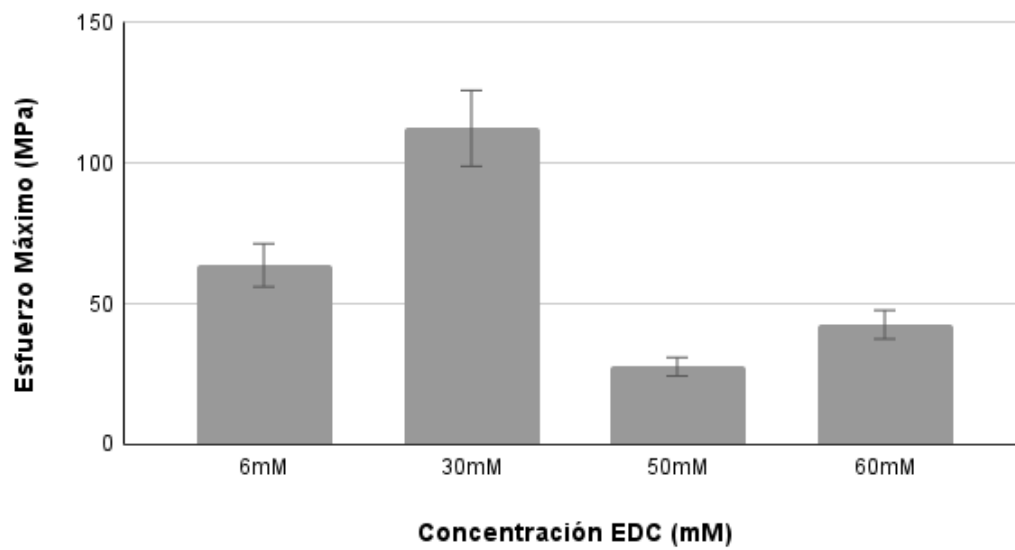


Figura 23. Gráfica del esfuerzo máximo a la elongación de los andamios de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán con diferentes concentraciones de EDC con el área efectiva

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso Carro G (2002) Aplicaciones clínicas y efectos terapéuticos del visco suplementación en la artrosis de rodilla. Servicio de traumatología Hospital Universitario la paz Madrid revista ortopédica traumatología 58 -464.
- Arellano Olivares (2017) Construcción de un andamio de gelatina ácido hialurónico con una membrana de PDMS, para el tratamiento de heridas cutáneas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Banerjee, I., Mishra, D., and Mailti, T. (2009) PGLA Microspheres incorporated gelatin scaffold: microspheres modulate scaffold properties. International Journal of biomaterial.
- Beltrán María y A. Marcilla (2012) Tecnología de polímeros, publicaciones de la Universidad de alicante.
- Brusco Herminia A., López Costa, Juan J. And Loidi César F. (2014) Histología médico-práctica. Elsevier. España
- Chabrand, P. (2018). Biomecánica del tejido óseo. Institut des sciences du mouvement (ISM). Université Aix-Marseille. France.
- Estrada, C., Paz, A.N., y López L.E. (2006) Ingeniería de tejidos óseos: consideraciones básicas. *Revista EIA* , (5), 93-100. Recuperado el 05 de marzo de 2022, de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-12372006000100008&lng=en&tling=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372006000100008&lng=en&tling=es)
- Fabres V. Cecilia (2010) Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y el uso de células madre en medicina reproductiva. Rev. Med. Clínica. Clínica Los Condes.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L (2006) Bases fisiológicas de la regeneración ósea II; el proceso de remodelado. Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. Vol. 11. Número 2.

- Fernández, I., Hernández, M. and Olvera, M. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I; histología y fisiología del tejido. Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. I Vol. 11. Número 1 febrero.
- Fortoul Teresa. (2017) Histología biología y celular. 3ra edición. Mc Graw Hill. Ciudad de México.
- Gartner, L. and Hiatt, J. (2011). Texto de histología. Elsevier. Barcelona, España.
- Giraldo A.O. (2004) Generalidades de las fracturas.[En línea] Disponible en: <https://www.efisioterapia.net/articulos/generalidades-las-fracturas> Consultado el 7 30 de junio del 2020.Guede, D., González, P., & Caeiro, J.R. (2013). Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral, 5(1), 43-50. <https://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2013000100008>
- Gutiérrez Gómez, J. (2008) El proceso de remodelación ósea. Escuela de medicina IESCH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Hermida Hilda (2011) Polímeros. Instituto Nacional de Educación tecnológica. República de Argentina.
- Hidalgo V. José (2015). Síntesis de esferas de Quitosán-Ti-O<sub>2</sub>-impresas molecularmente para la adsorción de Hg y la degradación fosfocatalítica del rojo de metilo como una alternativa en el tratamiento de aguas residuales. FES Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Edo de México, México
- Jarquín Yáñez, K. (2016) Construcción de un andamio de gelatina ácido hialurónico y microesferas de BMP-2 y VEGF [Tesis doctoral] México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de odontología
- Junquera, I. (2013) Proceso de curación de fracturas y retardos de consolidación. [En línea] Disponible en: [https://www.fisioterapia-online.com/articulos/proceso-de-curacion-de-las-fracturas-y-retardo-de-la-consolidacion#:~:text=El%20hueso%20es%20un%20tejido,tambi%C3%A9n%20consolidaci%C3%B3n%20%C3%B3sea\(1\)](https://www.fisioterapia-online.com/articulos/proceso-de-curacion-de-las-fracturas-y-retardo-de-la-consolidacion#:~:text=El%20hueso%20es%20un%20tejido,tambi%C3%A9n%20consolidaci%C3%B3n%20%C3%B3sea(1)). Consultado el 30 de junio de 2020.

- Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Lago, D., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (2016) Harrison. Principios de medicina interna. 19 ediciones. McGraw-Hill. Interamericana editores.
- Lizarbe, María A (2007). Sustitutos de tejidos de los biomateriales a la ingeniería de tejidos. Vol. 101. No1, Revista Academica.ciencia.exacta.fut.nat.
- Llanos Galvis, I. (2015) Fabricación y caracterización de andamios tridimensionales de Quitosano/ Oxido de Grafeno/ plastificante mediante el método de liofilización. Universidad de San Buenaventura. Santiago de Cali.
- Maji Kanchan, Dasgupta Sadip, Pramanik Krishna and Bissoyi Akalabya (2015) Preparation and evaluation of gelatin-chitosan-nanobioglass 3D porous scaffold for bone tissue engineering. International Journal of biomaterial. Volumen 2016.
- Mármol, Z., et al.2011. Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Venezuela
- Martínez H. David. (2006) Estudio de las propiedades mecánicas del tejido óseo y sus mecanismos de evaluación. Tesis de Licenciatura UNAM, México.
- Martin-Piedra A, Martin-Piedra L. Matrices para Ingeniería del tejido óseo. Actual. Med. [Internet] 2019; 104 : (806): 36-45 DOI: 10.15568/am.2019.806.re01
- Mikán, J.T. y Oliveros, W.D. (2007). Osteoclastogénesis y enfermedades óseas. Rev. Med. Bogotá, Colombia.
- Morales Navarro, D. (2014) Ingeniería Tisular como puntal de medicina regenerativa en estomatología. Facultad de estomatología. Habana, Cuba.
- Navarro M, A. 2005. Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea. Universidad politécnica de Catalunya

- Negri, A. (2011) Regulación de la mineralización ósea por factores inorgánicos y peptídicos. *Revista Argentina de endocrinología y metabolismo*. Sociedad Argentina de endocrinología y metabolismo. Volumen 84, número 4.
- Olivera D. Álvaro, Barreiro María and Lopretti M. (2012) Microesferas de quitosano como potenciales transportadores de ácidos nucleicos y otros bioactivos. *Revista iberoamericana de polímeros*. Montevideo, Uruguay.
- Pimentel-Parra A. and Murcia-Ordoñez B. (2017) Células madres, una nueva alternativa médica. Instituto Nacional de Perinatología. Caqueta, Colombia.
- Ramos Picos, D., Gómez Carril, M., Fernández Mena, D., y Núñez de la Fuente, L. (2000). Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Revista Cubana de Farmacia*, 34(1), 70-77. Recuperado en 03 de marzo de 2022, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152000000100010&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000100010&lng=es&tlng=es).
- Ramos Picos, D., Gómez Carril, M., Fernández Mena, D. (2001) Métodos para obtener microesferas biodegradables. *Rev. Cubana Farm.* V35. Ciudad de la Habana.
- Reyes, R., Rozas, P. and Muñoz, M. (2008) Regulación del proceso de remodelado óseo. Unidad de metabolismo óseo, servicio de endocrinología. Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España.
- Romero-Serrano, A. y Pereira J. (2020) Quitosano, un biomaterial versátil. Estado del Arte desde su obtención a sus múltiples aplicaciones. *Revista INGENIERÍA UC*, vol. 27, núm. 2. Universidad de Carabobo, Venezuela.
- Rosado Silva Ana Cristina (2013). Elaboración de reactivos biológicos para la implementación de un método inmunoenzimático para la determinación de grupos carbonilos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Zaragoza. México.

- Ross, Michael H. And Pawlina Wojciech. (2008) Histología texto y Atlas color con biología celular y molecular. 5ta edición. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Sáez Martínez Vivian, Hernández José Ramón, Peniche Carlos (2011). Microesferas de copolímeros de ácido láctico y glicólico cargadas con interferón alfa 2b y factor de crecimiento epidérmico. Obtención, caracterización y estudios de liberación
- Sebastián et al (2016) Ingeniería de tejidos y aplicaciones. Fondo editorial i.t.m. Medellín Colombia, 102-104.
- Sepúlveda Saavedra Julio. (2013) Texto atlas de histología: biología celular y tisular. Mac Graw Hill. Nuevo León, México.
- Serrato Ochoa, D., Nieto Aguilar R., Aguilera Méndez, A. (2015) Ingeniería de tejidos: Una disciplina en medicina regenerativa Investigación y ciencia, Vol.23, Núm. 63., Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Vázquez Torres Nadia Adriana (2019) Caracterización de un andamio electro hilado de Poli (ácido láctico y glicólico) / gelatina con factores de crecimiento para ingeniería de tejidos de la piel. Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX, México.