



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE ANDAMIOS DE
QUITOSANO CON CAPp5 EN LA REGENERACIÓN DE
DEFECTOS DE CALVARIA DE RATAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

LOURDES MAYARÍ TORRES CAMAS

TUTOR: Dra. LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ

ASESOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

A mi tutora, la Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez por todo su apoyo, consejos y comprensión durante todo el proceso de este proyecto.

A mi asesor, el Dr. Gonzalo Montoya Ayala por su disposición de ayudarme, por su paciencia y guía.

A mi compañero de laboratorio, César Téllez Zárraga, gracias a su amabilidad, apoyo y compañía en este trabajo.

Gracias por todo el tiempo y paciencia que tuvieron e invirtieron en mi, por compartirme sus conocimientos, experiencia y consejos. Les agradezco ser una inspiración para mi.

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la Facultad de Odontología por darme la oportunidad de participar en este proyecto.

Este trabajo se realizó con el apoyo de los proyectos PAPIIT de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM IT200123, IN206723 e IN212822.

DEDICATORIAS

A mi madre Teresita de J. Camas Reyes, por todo lo que me ha brindado en la vida, su apoyo , su amor, por insipirarme a siempre seguir adelante, por toda la ayuda que día a día me da. Gracias por sus enseñanzas que me han servido para llegar a este momento tan especial.

A mis hermanos Diego y Yunuen Camas, por cuidarme tanto desde la infancia hasta el día de hoy, por motivarme siempre, así como mi madre; por ser un ejemplo, por darme las herramientas y ganas de superarme todos los días.

A mis amigos incondicionales; Carlos, Denisse, Naholi, Tovi, Zenit. Gracias por todos sus consejos, por las charlas dramáticas, por las risas, por los buenos momentos, por el humor simple y por la amistad sincera.

Gracias por ser mis personas especiales, por permitirme compartir la vida a su lado y aprender de ustedes, por enseñarme que la vida es mejor si la comparto con ustedes, gracias por ser inspiración para pensar que siempre puedo ser mi mejor versión.
Les amo con todo mi ser.

EFFECTO DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE ANDAMIOS DE QUITOSANO CON CAP_{P5} EN LA REGENERACIÓN DE DEFECTOS DE CALVARIA DE RATAS.

ÍNDICE

[Índice de abreviaturas](#)

[RESUMEN](#)

MARCO TEÓRICO

Capítulo I Marco Teórico

1. Introducción	1
2. Composición del Hueso	2
2.1 Células óseas	3
2.2 Matriz ósea	4
2.3 Proteínas óseas	5
2.4 Biom mineralización	7
2.5 Remodelado óseo y Regeneración ósea	8
3. Ingeniería tisular	10
3.1 Células Troncales	10
3.2 Andamios o Scaffolds	12
3.2.1 Características	12
3.2.2 Tipos de andamio y su caracterización	12
3.2.3 Quitosan	14
I. Obtención	14
II. Propiedades Físicas y Químicas	15
III. Usos	15
3.2.4 Satín	15
3.3 Biomoléculas o factores de crecimiento	16
3.3.1 Factores de crecimiento	16
3.3.2 Péptidos	17
3.3.3 Proteínas de Cemento	18
I. CEMP1	18
II. HACD1/CAP	19
a. CAPp5	19

Capítulo II Marco Metodológico

2.1 Planteamiento del problema y justificación	21
2.2 Pregunta de Investigación	21
2.3 Hipótesis	21
2.4 Objetivo General	21
2.5 Objetivos específicos	21
2.6 Universo o muestra	22
2.6.1 Síntesis del péptido CAPp5	22
2.6.2 Caracterización de andamios	22
2.6.3 Cirugía en ratas Wistar	22

Capítulo III Resultados y análisis de la información obtenida.

3.1 Resultados	25
3.2 Análisis estadístico	29
3.3 Discusión	30
3.4 Conclusiones	33

<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	34
--	----

Índice de Abreviaturas.

CAPp5	-	Péptido de 5 aminoácidos de la Proteína de unión al Cemento.
HACD1/CAP	-	Hidroxiacil coenzima A deshidratasa 1/ Proteína de unión al cemento.
IT	-	Ingeniería Tisular.
Runx2	-	Factor de transcripción Cbfa1.
BMPs	-	Proteínas Morfogenéticas Óseas.
Osx	-	Osterix.
Wnt/LRP5	-	Vía de señalización Wingless/ Receptor de Proteína de baja densidad 5.
BSP	-	Sialoproteína Ósea.
ALP	-	Fosfatasa Alcalina.
MMPs	-	Metaloproteinasas de la Matriz.
PTH	-	Hormona Paratiroidea.
M-CSF	-	Factor estimulante de Colonias de Macrófagos.
VEGF	-	Factor de crecimiento endotelial vascular.
FGF23	-	Factor de crecimiento Fibroblástico 23.
RANKL	-	Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B.
TNF	-	Factor de Necrosis Tumoral.
IL	-	Interleucina.
CFU-GM	-	Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos.
OPG	-	Osteoprotegerina.
RANK	-	Receptor Activador para el factor nuclear κ B.
PNC	-	Proteínas No Colágenas.
OPN	-	Osteopontina.
OCN	-	Osteocalcina.
TGF-B	-	Factor de Crecimiento Transformante B.
PDFG	-	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
BMU	-	Unidades Básicas Multicelulares.
DBM	-	Matriz ósea Desmineralizada.
NANOG	-	Factor de transcripción relacionado con la autorrenovación de células madre embrionarias.
OCT4	-	Factor de transcripción de unión a octámero 4.
PGA	-	Ácido Poliglicólico.
PLA	-	Ácido Poliláctico.
PMMA	-	Polimetilmetacrilato.
RGD	-	Secuencia de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido aspártico.
CAD	-	Diseño Asistido por Computador.
DA	-	Grado de desacetilación.
GM-CSF	-	Factor estimulante de Granulocitos y Macrófagos.
FDA	-	Administración de Alimentos y Medicamentos.
SPPS	-	Síntesis de Péptidos en Fase Sólida.
PTM	-	Modificaciones Postraduccionales.
PS	-	Péptido Sintético.

PN	-	Péptido Nativo.
HA	-	Hidroxiapatita.
LP	-	Ligamento Periodontal.
LBPTM	-	Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados.
PLGA	-	Poli(ácido láctico-co-glicólico).

Las abreviaturas se encuentran organizadas por orden de aparición.

Resumen

El hueso es un tejido conjuntivo especializado mineralizado muy vascularizado e innervado compuesto por laminillas de matriz osteoide calcificada; dependiendo de su disposición se puede clasificar en hueso cortical (compacto) o esponjoso (trabecular), ambos tipos de hueso están formados por células especializadas, matriz orgánica y fase mineral. Se considera un tejido de soporte y protección de estructuras vitales; además, actúa como principal reservorio de calcio y fósforo y contribuye en la homeostasis de estos minerales. El hueso está en constante remodelación (secreción de osteoide, mineralización y reabsorción), cuando este equilibrio se rompe debido a factores locales, sistémicos y/o genéticos incrementa el riesgo a fracturas o pérdida ósea. Actualmente, se han desarrollado alternativas terapéuticas, como la ingeniería tisular ósea, para restituir el tejido dañado y su funcionalidad mediante el uso de células troncales, andamios tridimensionales de materiales biocompatible, biodegradables, bioactivos que no sean tóxicos en combinación con biomoléculas o factores de crecimiento.

Dentro de los biomateriales para fabricar los andamios se encuentra el quitosano que por sus propiedades fisicoquímicas: de biocompatibilidad, no toxicidad, biodegradabilidad y agente antimicrobiano, cumple con las características ideales para realizar andamios mimetizados con péptidos y usarse en la regeneración tisular ósea.

Este proyecto de investigación tuvo como objetivo, determinar si la combinación de un andamio de quitosano y un péptido bioactivo (CAPp5) promovía la regeneración de tejido óseo en un modelo de defecto óseo crítico en calvarias de ratas Wistar (machos).

Los resultados obtenidos demostraron que la combinación de los andamios de quitosano y CAPp5 promueve la formación de un nuevo tejido a los 4 meses posquirúrgicos. Este nuevo tejido formado muestra características histológicas asociadas a un tejido óseo vital al demostrarse la presencia de vasos sanguíneos necesarios durante la regeneración tisular. De manera muy importante, se observó la degradación completa del andamio de quitosano sin presencia inflamatoria.

Con base en lo anterior, el empleo del péptido CAPp5 en un andamio de quitosano, podría surgir como una nueva alternativa en la regeneración ósea.

1. Introducción.

La ingeniería de tejidos (IT) tiene su origen a principios de la década de 1990, cuando Langer y Vacanti (1993) la definen como un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería, de la biología, la ciencia de los materiales, la química y la medicina hacia el desarrollo de sustitutos biológicos con el objetivo de restaurar, mantener y mejorar la función tisular con el fin último de la regeneración completa de tejidos u órganos dañados. La IT incluye dos enfoques principales:

1. El trasplante de un tejido cultivado *in vitro* que consta de una matriz artificial con células y factores de crecimiento
2. La regeneración *in situ* de tejido utilizando una combinación de una matriz artificial y factores de crecimiento como plantilla o guía para inducir la regeneración de la célula huésped del tejido vivo.

Las estrategias tradicionales de la IT implica el uso de células vivas en un andamio natural, sintético o bio-artificial en combinación de señales biológicas para desarrollar un sustituto biológico o una construcción viva en 3D que sea estructural, mecánica y funcionalmente igual a un tejido. ¹

El hueso es un tejido conjuntivo altamente vascularizado, duro y rígido que brinda soporte estructural, protegiendo tejidos y órganos blandos vulnerables dentro del cuerpo. Podemos encontrarlo en forma compacta o con trabéculas (esponjoso). Este tejido está compuesto de células especializadas rodeadas de una matriz extracelular mineralizada constituida por una fase inorgánica (principalmente hidroxiapatita) y una fase orgánica compuesta por colágena tipo I y proteínas no colagénicas. La organización tridimensional de la matriz extracelular del hueso permite la transmisión de tensiones mecánicas, que se ha demostrado ser fundamental para el desarrollo óseo. Hay tres tipos principales de células dentro del tejido óseo: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. La actividad sinérgica de osteoblastos y osteoclastos que secretan y reabsorben la matriz extracelular en el proceso de remodelación ósea mantienen la homeostasis natural de este tejido. De toda la población de células óseas, los osteocitos representan más del 90% y son los responsables de detectar y transducir las fuerzas mecánicas transmitidas a través del hueso y, en consecuencia, orquestar las señales de reabsorción y síntesis ósea. ²⁻⁵

Este delicado equilibrio antagónico entre las actividades de formación ósea de los osteoblastos frente a las actividades de reabsorción ósea de los osteoclastos se puede ver afectado por lesiones traumáticas, fracturas por osteoporosis, deformidades, inflamación y tumores malignos que comprometan la integridad e incluso conlleve a la pérdida de tejido óseo. Actualmente, el autoinjerto es considerado como el estándar de oro para el tratamiento de defectos óseos significativos. Sin embargo, la limitación de la disponibilidad del injerto óseo, la morbilidad del sitio donante y el riesgo potencial de infección y hematoma, ha impulsado el desarrollo de nuevas alternativas. ^{6,7}

La ingeniería de tejidos óseos es un campo interdisciplinario originado para reparar o reemplazar el hueso mediante la creación de sustitutos biomiméticos. Para tener mayor

claridad en los mecanismos moleculares y bioquímicos que participan durante la regeneración tisular, es necesario revisar la fisiología ósea.

2. Composición del Hueso.

El tejido óseo, dependiendo de su estructura, se puede clasificar en compacto o cortical, que se observa como una capa densa que contiene osteonas o sistemas de Havers que provee del suministro vascular, fibras nerviosas y tejido conectivo. A su alrededor se encuentran la matriz ósea en forma de laminillas concéntricas de aproximadamente de 3 μm de espesor, además de presentar los denominados conductos de *Volkman* ubicados perpendicularmente a las osteonas y que sirven para su comunicación. El tejido óseo trabecular (o esponjoso) se compone de aproximadamente 20 laminillas en forma de espículas, donde los espacios entre cada espícula está ocupada por médula ósea.

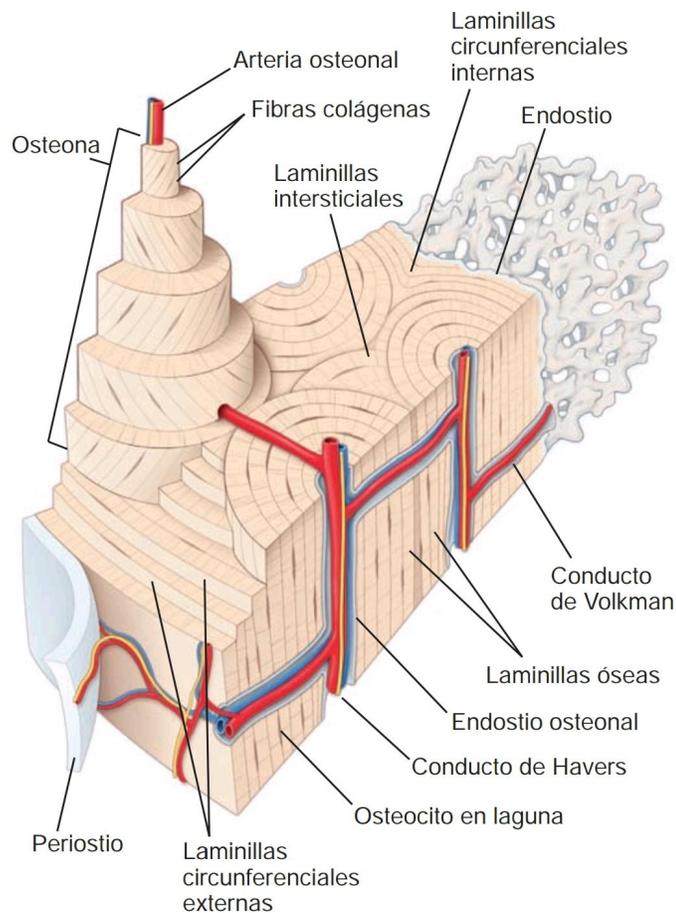


Fig.1) Diagrama de la estructura de hueso compacto. Tomada del libro Ross. *Histología: Texto y atlas: Correlación con biología molecular y celular*. 7ª edición.

Las superficies externas de los huesos están rodeadas por una capa de tejido conectivo denso llamado periostio; mientras que el endostio es una membrana delgada, que recubre las superficies óseas internas, formada de una capa de células osteoprogenitoras capaces de diferenciarse en osteoblastos y células de revestimiento óseo.³

Otra forma de clasificar al tejido óseo es en hueso inmaduro que se caracteriza por la presencia de fibras colágenas gruesas y desordenadas con células distribuidas al azar proporcionándole mayor flexibilidad y poca resistencia. Este tipo de hueso se observa en la etapa embrionaria hasta los 4 años de edad, también en patologías como la formación del callo óseo en fracturas, tumores o enfermedades. Por otro lado, el hueso maduro o laminar está mejor organizado y sus fibras colágenas se observan más estructuradas.^{5,8}

2.1 Células Óseas.

El tejido óseo presenta varios tipos de células: **1) células osteoprogenitoras** que se encuentran en la capa celular interna del periostio, se derivan de las células troncales mesenquimatosas de la médula ósea. Tienen el potencial de dividirse y dependiendo del tipo de señal molecular que reciben pueden diferenciarse en osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos y células musculares. Su diferenciación hacia osteoblastos está controlada por los genes de la familia Hedgehog junto con el factor de transcripción Cbfa1 (Runx2) y proteínas morfogenéticas óseas (BMP's).^{3,4} **2) Osteoblastos**, se producen bajo vías de señalización específicas como las BMP (2, 4, 5, 6 y 7) que estimulan la expresión de los factores de transcripción Runx2 y Osx (orientan la diferenciación de células troncales mesenquimales a la vía osteoblástica) y la vía Wnt/LRP5, principal mecanismo de control de la formación ósea. Se consideran las células formadoras de hueso por sintetizar y secretar matriz ósea orgánica (osteóide), además de poseer la capacidad de secretar colágena tipo I, proteínas como osteocalcina y osteonectina, glucoproteínas multiadhesivas (osteopontina BSP1, BSP2 y trombospondina), fosfatasa alcalina (ALP), metaloproteinasas de la matriz (MMPs) de forma inactiva y proteoglicanos. Al día pueden secretar de 2 a 3 μm de sustancia osteóide y la expresión de ALP permite mineralizarla de 1 a 2 μm por día. También tienen receptores para vitamina D₃ y hormona paratiroidea (PTH) que activan la resorción ósea (regulan la osteoclastogénesis) y con ello ayudan en la movilización de calcio en el organismo, secretando factor estimulante de colonias de Macrófagos (M-CSF) para inducir la proliferación y diferenciación de pre-osteoclastos. Así mismo, promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos al secretar factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), importante durante la formación de hueso nuevo y reparación de defectos óseos.^{4,5,8-10} **3) Osteocitos** son osteoblastos que quedan atrapados en la matriz ósea recién formada, se comunican con otros osteocitos y células de revestimiento mediante prolongaciones por donde circulan iones y moléculas que permiten la nutrición a través del líquido intersticial. Responden a fuerzas mecánicas aplicadas al hueso (mecanosensores); además, participan en la homeostasis del calcio gracias a su capacidad de secretar MMPs y usar los canalículos para movilizar los iones calcio (proceso denominado osteólisis osteocítica), y secretan factor de crecimiento fibroblástico (FGF23) que regula el metabolismo del fósforo. Además pueden controlar el comportamiento de osteoclastos secretando RANKL, TNF- α , IL-6 e IL-11. La vida media de los osteocitos oscila de los 10 a 25 años.^{3,5,8} **4) Células de revestimiento** derivan de osteoblastos que se organizan en la superficie ósea, son células planas que forman una barrera entre la médula hematopoyética y el osteóide. Participan en la red de

comunicación que regula la remodelación ósea; bajo el efecto de la PTH pueden convertirse en osteoblastos y se inhiben por la acción de glucocorticoides.^{3,5,8,9} **5) Osteoclastos**, proceden de la fusión de células troncales hematopoyéticas medulares llamadas Unidades formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM). Para que suceda su diferenciación se requieren de tres moléculas que regulan este proceso; la osteoprotegerina (OPG) sintetizada por osteoblastos y preosteoblastos, el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANK-L) en la superficie de osteoblastos y preosteoblastos y su receptor (RANK en la membrana de osteoclastos y preosteoclastos. Cuando se da la interacción entre RANK-L y RANK, se activa la diferenciación y su actividad osteoclástica aumenta la reabsorción osteoclástica. La OPG funciona como inhibidor de RANKL. Son células de gran tamaño que pueden tener de 5 hasta 50 núcleos y un diámetro de hasta 100 μ m de diámetro, poseen dos polos celulares y muchas vesículas que contiene catepsina K, MMPs, que son algunas de las enzimas más importantes producidas por éstas células ya que degradan la matriz ósea orgánica y acidifican el la zona produciendo portones para disolver la matriz ósea inorgánica; convirtiéndose ésta en iones calcio, fosfatos inorgánicos solubles y agua.^{4,5,8-10}

2.2 Matriz Ósea.

El hueso está compuesto en un 90% por matriz orgánica y el 10% restante por matriz inorgánica. Además de considerarse como un reservorio de calcio y fosfato, es una reserva de proteínas participantes en la regulación de la diferenciación celular, integridad y función del tejido óseo. La **matriz orgánica** está compuesta por fibras colágenas en un 90%, principalmente de colágena tipo I (>95%), tipo V (5%), tipo III, en menor proporción colágena tipo XI, XIII y sustancia fundamental compuesta por cuatro principales grupos de proteínas no colágenas (PNC) (proteoglucanos, glucoproteínas, proteínas osteoespecíficas y factores de crecimiento, descritas en la tabla 1). Las fibras de colágena forman una red que permite incorporar moléculas de hasta 40 kDa y se da una escisión de péptidos en sus extremos amino y carboxil terminales para asociarse a PNC con lo cual podrá formar el osteoide, que se mineralizará por efecto de los osteoblastos.^{3-5, 8.} La **matriz inorgánica** se compone de sales minerales, principalmente por fosfato de calcio cristalino en forma de cristal de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ que se dispone en placas finas de 3 nm de espesor y 60 nm de largo; en espacios de 40 nm entre los extremos de las fibras colágenas llamados “zonas hole”.^{3,5, 11}

2.3 Proteínas Óseas.

Proteína		Función.
Colágena	Tipo I, III, V, XII, XI, XIII.	Aportan resistencia mecánica y flexibilidad al hueso, cartílago, ligamento y tendones. Se sintetiza a partir del pro-colágeno y en el tejido óseo son los osteoblastos los encargados de secretar esta proteína. ¹²
Proteoglicanos		
	Condroitín sulfato	Intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea ofreciendo resistencia a la compresión, fijación de factores de crecimiento e inhibición de la mineralización. ^{4,8}
	Hialuronato	
	Biglicano	Aparecen en las siguientes fases de la formación ósea. ^{2,3}
	Decorina	
Glicoproteínas		
	Osteonectina	Glucofosfoproteína multiadhesiva secretada por osteoblastos, puede unir células óseas y fibras de colágeno tipo I a la hidroxiapatita . ³⁻⁵
	Fosfatasa alcalina (ALP)	Es una proteína glucosilada que regula concentraciones extracelulares de fosfatos. ¹³
	Osteopontina (OPN)	Proteína fosforilada que regula la migración, diferenciación y supervivencia celular, además de poder regular la adhesión y diferenciación de osteoblastos y modular el crecimiento de cristales en la mineralización. Favorece la angiogénesis en la reparación ósea. ¹³
	Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP)	Glicoproteínas fosforiladas, su actividad se relaciona con la función de adhesión celular y participa en el inicio de la mineralización. Son secretadas por osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y condrocitos hipertróficos. Es importante su acción durante la formación de osteoide y su mineralización. Favorece la proliferación, diferenciación y actividad de osteoclastos y osteoblastos. ^{5, 13}
	Osteocalcina (OCN)	Producida por osteoblastos y plaquetas dependientes de vitaminas D y K. Se une a los cristales de hidroxiapatita y solo se produce en tejido óseo por lo que resulta útil su expresión en concentración plasmática refleja el grado de remodelación ósea. La vitamina D favorece su síntesis y los corticoides la inhiben. ³⁻⁵

Factores de crecimiento		
	IGF-I y II	Sintetizados por hígado y osteoblastos. Aumentan la proliferación y actividad de osteoblastos y con ello la síntesis de colágena. Además de controlar la interacción entre osteoblastos y osteoclastos interviniendo en el remodelado óseo. ¹⁴
	TGF- β	Induce la diferenciación de osteoblastos y aumenta la producción de osteoide. Interviene en la reabsorción ósea al inhibir la síntesis de proteínasas como las MMPs y disminuir la proliferación y diferenciación de osteoclastos. ¹⁴
	PDGF	Funciona como quimioatrayente y factor miogénico de células troncales y osteoblásticas para aumentar la producción de proteínas de la matriz ósea. ^{9, 15}

Tabla 1. Descripción de la función de las principales proteínas que componen la matriz orgánica del hueso.

2.4 Biomineralización.

Es un proceso fisiológico regulado por interacciones entre moléculas y minerales. El proceso comienza con la acumulación de iones de fosfato dentro de las vesículas de matriz que son liberadas al medio extracelular desde la superficie de condrocitos, osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos; los iones de fosfato de calcio se precipitan formando cristales amorfos que rompen la membrana de la vesícula y quedan expuestos en el medio extracelular donde forman nódulos de calcio. Estos cristales crecen dentro de las fibras de colágena que sirven como andamio para la precipitación de iones.

El crecimiento, grado de maduración de la fase mineral y morfología de los cristales son mediados por el pH, supersaturación de iones y por la presencia de proteínas no colágenas y proteoglicanos que gracias a su carga negativa e interacción con otras moléculas son capaces de quelar iones de calcio induciendo la cristalización o inhibiendo la mineralización.¹¹

Por acción de la osteocalcina y otras proteínas se eleva a una alta concentración local de iones Ca^{2+} , lo que provoca que los osteoblastos secreten fosfatasa alcalina (ALP), y esto a su vez provoca un aumento en la concentración local de iones PO_4^{3-} . Todo este proceso estimula de nuevo un aumento de la concentración antes elevada de iones Ca^{2+} para dar inicio a la mineralización. Cuando se excede la capacidad de disolución de estos dos iones, se liberan las vesículas matriciales hacia la matriz ósea. Estas vesículas contienen ALP y pirofosfatasa que rompen iones PO_4^{3-} de otras moléculas cercanas de la matriz; provocando la cristalización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en la vesículas matriciales alrededor.

Los cristales de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ inician la mineralización de la matriz circundante a los osteoblastos al formar y depositar cristales de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. Una vez que estos cristales se precipitan, crecen por acreción y se van uniendo con cristales vecinos productos de otras vesículas matriciales.

Todo este proceso se realiza de 10 a 20 días posteriores a la formación de la matriz ósea orgánica. De 3 a 4 días se concreta alrededor del 80% del mineral óseo a lo que se le llama mineralización primaria. La mineralización secundaria se produce cuando el agua ligada a los cristales de hidroxiapatita se mineraliza, después de 3 a 4 meses.^{3, 8, 10.}

Este proceso es regulado por proteínas y células óseas como condroblastos y osteoblastos que sintetizan y secretan matriz ósea orgánica para después mineralizarla dando como resultado dos tipos de osificación:

La *osificación intramembranosa* es un proceso que comienza con un centro de osificación donde células osteoprogenitoras se diferencian a osteoblastos para secretar osteoide, formando una red de espículas y trabéculas, este centro crece por depósito periférico de matriz donde se incorporan osteoblastos que se transforman en osteocitos. Se va formando hueso inmaduro y el tejido óseo en la periferia se va engrosando haciendo que los espacios de tejido conectivo se estrechen de forma gradual y se ocupen por médula ósea. Las zonas de tejido sin calcificar se diferencian en periostio y endostio. Cuando las

trabéculas formadas contactan con zonas vecinas se genera un tejido óseo esponjoso con tejido conectivo vascularizado entre los espacios. Esta osificación se observa en huesos planos del cráneo y la cara, así como en partes de la mandíbula y de la clavícula.

La *osificación endocondral* forma la mayoría de huesos largos y cortos del cuerpo, el hueso se comienza a formar sobre un molde de cartílago hialino que sirve como andamio para el desarrollo de hueso con cavidades invadidas por vasos sanguíneos y células osteogénicas. Su desarrollo se debe a los centros de osificación primario y secundarios; con la proliferación y acumulación de células mesenquimáticas que por acción de factores FGF y BMP's, se diferencian en condroblastos produciendo matriz cartilaginosa y formando un modelo de cartílago hialino que se va degradando formando lagunas y una cavidad que almacena la médula ósea con matriz cartilaginosa calcificada como guía para los osteoblastos generando un complejo de cartílago y hueso calcificado.^{3, 8-10}

2.5 Remodelado y Reparación ósea.

El tejido óseo se puede ver afectado por diferentes factores como enfermedades sistémicas y genéticas (osteoporosis, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget), ambientales, infecciones, traumas y neoplasias. Por lo que son diversas las etiologías que pueden condicionar el riesgo a fracturas y a la pérdida de masa ósea.

El **remodelado óseo** es un proceso constante de formación y reabsorción con lo cual se puede mantener un metabolismo fosfocálcico. Este equilibrio permite la renovación anual de hueso cortical en un 5% y de hueso trabecular en un 20% aproximadamente. El proceso de remodelado tiene un balance positivo sólo hasta la tercera década de vida, en esta década existe la máxima masa ósea y se mantiene hasta los 50 años aproximadamente. Se produce en áreas de la cortical llamadas **unidades básicas multicelulares (BMU)**; la vida media de cada unidad es de 2 a 8 meses y en el esqueleto humano existen un aproximado de 35 millones de BMU, al año se activan de 3 a 4 millones, por lo que la renovación del esqueleto en su totalidad se da cada 10 años.¹⁶

El proceso de remodelado se da por las siguientes 5 fases.

1. Fase quiescente. El hueso en condiciones de reposo.
2. Fase de activación. Las células limitantes (osteoblastos en la superficie endóstica) se retraen y la membrana endóstica sufre un proceso de digestión por parte de las colagenasas, se queda expuesta la superficie mineralizada y atrae osteoclastos.
3. Fase de reabsorción. Los osteoclastos disuelven la matriz mineral y descomponen la matriz osteoide, el proceso termina con los Macrófagos y se liberan factores de crecimiento, especialmente factor transformante de crecimiento β , (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y factor análogo de insulina I y II (IGF-I y II).

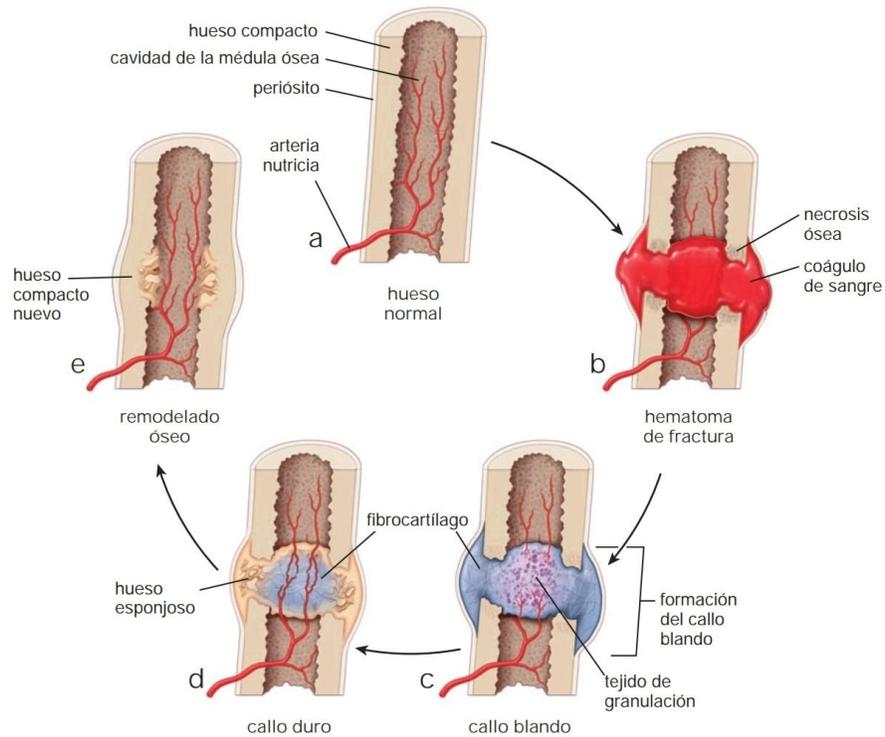


Fig.2) Proceso de reparación ósea ante una lesión. Tomada del libro Ross. *Histología: Texto y atlas: Correlación con biología molecular y celular*. 7ª edición.

4. Fase de formación. Se da un agrupamiento de preosteoblastos que sintetizan una sustancia cementante, donde se adhiere nuevo tejido, y se expresan proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Después de pocos días los osteoblastos sintetizan sustancia osteoide para rellenar las zonas reabsorbidas. Esta fase dura 30 días.
5. Fase de mineralización. La mineralización se finaliza después de 130 días para el hueso cortical y 90 días para el hueso trabecular. Después de este tiempo se comienza de nuevo con la fase quiescente.¹⁶

La **regeneración ósea** es una respuesta del tejido ante una lesión, con la cual se puede restituir el tejido perdido con características iguales al original, en cambio el proceso de reparación forma un tejido cicatricial con distintas características al del original. Durante el proceso de regeneración se involucran vasos sanguíneos, células y matriz extracelular. Iniciando la respuesta inflamatoria con hematíes, plaquetas y fibrina: las células del coágulo comienzan a liberar interleucinas y factores de crecimiento para la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales promoviendo la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos para dar origen al nuevo tejido que reemplazará al coágulo inicial por las interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. En esta fase es imprescindible el aporte vascular para la síntesis proteica la mineralización del nuevo tejido.⁴ Con esta técnica se emplean injertos que tengan propiedades 1)

osteogénicas, capaces de producir hueso nuevo. Dependen de células osteoprogenitoras y con potencial para diferenciarse. Estas células participan en las etapas iniciales del proceso de regeneración. Por lo que esta propiedad osteogénica solo se encuentra en injertos óseos autólogos o células de médula ósea.¹⁷ 2) *osteoconductiva*, los injertos pueden servir como andamios o estructura de soporte para la regeneración ósea ya que permite la neovascularización e infiltración de células precursoras osteogénicas. Los materiales que tiene esta propiedad osteoconductora son los autoinjertos, homoinjertos, aloinjertos, matriz ósea desmineralizada (DBM), hidroxiapatita, fosfato de calcio y la colágena.¹⁷ 3) *osteoinductivas*, inducen la diferenciación de células mesenquimatosas a células óseas maduras. Esta propiedad está relacionada con la presencia de factores de crecimiento; y dentro de los materiales osteoinductivos se encuentran los injertos óseos autólogos, la proteína morfogenética ósea (BMP) y la matriz ósea desmineralizada (DBM).¹⁷

Aunque estos tipos de injerto son una buena opción para la regeneración ósea, aún tienen muchas limitantes como la cantidad de hueso disponible para la dimensión de la lesión y complicaciones como transmisión de enfermedades y respuestas antigénicas.¹⁴ Es por estas complicaciones que se han investigado y desarrollado otras alternativas regenerativas como lo es la ingeniería tisular.

3. INGENIERÍA TISULAR.

El objetivo de la ingeniería tisular es crear tejidos iguales o lo más similar posible al tejido dañado para restaurar, sustituir o aumentar la actividad funcional de los tejidos orgánicos. Para esto, se necesitan aislar y cultivar células en laboratorios y tener disponibles biomateriales que puedan sustituir las matrices extracelulares y que tengan un comportamiento muy parecido a los tejidos que serán sustituidos.¹⁵

La Ingeniería tisular se basa en tres elementos fundamentales que son las células troncales por su alta capacidad proliferativa y su pluripotencialidad, las biomoléculas o factores de crecimiento y los andamios.

3.1 Células troncales.

Las células troncales, anteriormente llamadas células madre, son capaces de dividirse indefinidamente y diferenciarse para dar origen a células idénticas a sí mismas y también de diferenciarse a células especializadas, tanto morfológicamente como funcionalmente.^{15,18.}

A finales del siglo XX, Ernst Haeckel denominó por primera vez como "Stammzelle" (células troncales), al organismo antecesor común de todos los organismos multicelulares. Posteriormente Theodor Boveri observó que las células troncales o "células germinales primordiales", eran un grupo de células que derivaban del cigoto en el desarrollo y podían dividirse para dar origen a una célula precursora de células somáticas o a otras células similares. Artur Pappenheim estudió la hematopoyesis elaborando diagramas para

representar la célula predecesora de la sangre, que origina los linajes de las células hematopoyéticas, dándole el nombre de "Mutterzellen" (célula madre).¹⁵

Se localizan en la médula ósea, sangre, huesos, músculos, piel, tejido adiposo, principalmente. Dependiendo del tejido donde se encuentren ubicadas pueden estar inactivas y proliferar cuando se presenta alguna lesión para repararla o ayudar a las células durante el recambio normal.¹⁸

Las células troncales se pueden clasificar por su momento de origen en células embrionarias y células adultas (somáticas o postnatales).

a) Células embrionarias.

Derivan del blastocisto, una vez que ocurre la fecundación del óvulo y se forma. En esta etapa del blastocisto es cuando se pueden aislar las células troncales. Son totipotentes y pluripotentes, cuentan una capacidad de autorrenovación y diferenciación infinita debido a factores de transcripción como NANOG y OCT4.^{15,18}

b) Células adultas / somáticas.

Son células indiferenciadas y especializadas que derivan de las células embrionarias y se ubican en los tejidos u órganos. Se pueden diferenciar dependiendo la necesidad de cada tejido u órgano donde se encuentran y cuentan con una capacidad multipotencial; ideal para la terapia regenerativa.^{15,18}

Existe otra clasificación para las células troncales, y es de acuerdo a su capacidad de diferenciarse.¹⁵

a) Totipotenciales. Son células capaces de dividirse y reproducir cualquier célula del organismo.

b) Pluripotenciales. Células con capacidad para diferenciarse en cualquier tipo de célula de los tejidos endodérmico, mesodérmico o ectodérmico.

c) Multipotenciales. Células que se pueden dividir y formar varios tipos de tejidos y órganos.

d) Unipotentes. Son las células que pueden formar un solo tipo de célula.

Las células troncales embrionarias a pesar de sus increíbles propiedades para renovarse y diferenciarse, pueden generar tumores o generar respuestas inmunológicas por su origen alogénico. Además su obtención entra en un dilema ético y legal. Es por ello que para la medicina regenerativa se utilizan las células troncales adultas; aunque para su obtención se necesita un proceso más largo con cultivos celulares que pueden dañarse durante el cultivo, su manipulación es más sencilla.

Las células troncales que se emplean para la terapia regenerativa dentro de la ingeniería tisular son células mesenquimales provenientes principalmente de la médula ósea, aunque también pueden aislarse del tejido adiposo, la pulpa dental, de sangre periférica y del cordón umbilical, entre otros sitios. Son células que pueden autorenovarse y diferenciarse hacia un linaje osteogénico, condrogénico, adipogénico e incluso miogénico.

Su aplicación en la ingeniería tisular es para reparar, reconstruir o regenerar tejidos u órganos dañados por enfermedades cardiovasculares, diabetes, lesiones por trauma o tumores, entre otros. Para que puedan ejercer su acción regenerativa se deben aplicar las células troncales con factores de crecimiento que dirigirán los procesos celulares y un andamio tridimensional elaborado con un biomaterial para guiar y permitir el crecimiento del nuevo tejido.

3.2 Andamios o Scaffolds.

Los andamios son estructuras tridimensionales y que funcionan como soporte para crear un microambiente adecuado con el cual se pueda conseguir el crecimiento y diferenciación celular, promover la adhesión y migración celular para poder formar tejidos y órganos funcionales. Sirven temporalmente como una matriz extracelular.

3.2.1 Características.

Para cumplir con su función, los andamios necesitan tener una serie de requisitos como una alta porosidad (con un tamaño y forma adecuados para permitir la difusión de nutrientes), un área grande de superficie, una buena degradación, tener una buena resistencia física y mecánica, ser biocompatible con el tejido a regenerar y con biomoléculas como lo son los factores de crecimiento o péptidos para poder mimetizarse.

3.2.2 Tipos de andamio y su caracterización.

Los andamios pueden clasificarse en dos tipos:¹⁵

- a) Sintéticos, inorgánicos o permanentes.

Se producen de materiales cerámicos, metálicos y de polímeros. Los andamios hechos de polímeros se forman de criogeles, sistema hidrogel, ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico (PLA) se usan principalmente para realizar andamios 3D. Sin embargo tienen una baja bioactividad. Los crio-geles tienen una buena porosidad, permitiendo una buena circulación de nutrientes y una buena resistencia mecánica debido a la microporosidad y conectividad entre poros obtenida por ser sintetizados a bajas temperaturas. Los hidrogeles que se componen de PMMA (polimetilmetacrilato) y péptidos RGD, funcionan con monómeros que al inyectarse en el cuerpo se polimerizan; cuentan con una buena fuerza mecánica y son biodegradables, pero cuando sucede la fotopolimerización, puede afectar la viabilidad de las células. Dentro de los andamios metálicos se encuentran los fabricados con titanio, que es un material biocompatible, con actividad osteoconductiva y vasculogénica.

b) Naturales, biodegradables u orgánicos.

Se realizan de componentes de la matriz extracelular como colágena, ácido hialurónico, hidroxiapatita, glucosaminoglucanos, entre otros. Las ventajas de usar este tipo de andamios es que son bioactivos, biocompatibles y sus propiedades mecánicas son muy similares a las del tejido a regenerar. Sin embargo, sus propiedades fisicoquímicas son difíciles de controlar. Este tipo de andamios tiene una estructura porosa tridimensional cuyos macro poros son de aproximadamente 100µm, para que pueda haber un crecimiento celular, una adecuada vascularización y se pueda eliminar el material de desecho. A su vez, los andamios naturales se subclasifican en crio-geles, hidrogeles, espumas bioactivas y materiales biocompuestos.

Los más utilizados son los hidrogeles, compuestos de un polímero hidrofílico para formar las redes tridimensionales con macromoléculas similares a los componentes del cuerpo y tienen una alta biocompatibilidad. Su estructura es ideal para transportar factores solubles, nutrientes y desechos. Los hidrogeles se clasifican en macro porosos e inyectables. Dentro de los hidrogeles macroporosos se encuentran los que se sintetizan a partir de materiales como agarosa, alginato, **qitosano**, colágena, y ácido hialurónico. Es de los más usados para la regeneración de cartílago y tejido óseo por ser de costo accesible, biocompatible y rápida solidificación. Los hidrogeles inyectables, su acción es formar un gel in vivo del material líquido para rellenar defectos de cualquier tamaño y forma. Otra función que cumplen es el de ser un soporte líquido que sirve como transporte de células vivas, medicamento o factores de crecimiento para la regeneración del tejido.

Así como existen diversos tipos de biomateriales para la fabricación de los andamios, existen diferentes tipos de técnicas de fabricación con la que se realizan, cada una de las cuáles le otorgan al andamio las características más adecuadas a los requisitos del tejido dañado, el grado de la lesión y su tamaño. Se mencionarán algunas de estas técnicas, sin embargo, no son las únicas que se emplean para la fabricación de andamios:¹⁹ 1) *electrohilado*, se crean micro y nanofibras poliméricas de diferente morfología, por fuerza electrostática, su orientación es al azar formando una red tridimensional que logra imitar la matriz extracelular para proveer una buena adhesión y proliferación celular. 2) *espumado con gas*, se forman discos de polímero comprimidos que se calientan y posteriormente se usa CO₂ para reducir la presión y formar los poros sin conexión que varían de 100 a 500µm, esta técnica se suele usar con la de lixiviación para crear una red de poros interconectados. 3) *hidrogeles*, se usan Biopolímeros que tengan una gran capacidad hidrófila y elástica, pueden formar una red tridimensional con poros interconectados, además este tipo de andamio por su capacidad de absorción se usa para liberar biomoléculas durante el proceso de regeneración. 4) *impresión 3D*, esta es una de las técnicas con las cuales se puede usar una gran variedad de biomateriales, para ello se necesitan técnicas imagen o lógicas, un software tipo CAD y un robot que ejecute el proceso. Se pueden formar andamios del diseño y tamaño especializado para cada

paciente, sin embargo, con esta técnica se debe esperar a que el tejido bio-impreso se fusiones, remodele y madure para ser un tejido funcional antes de ser utilizado.

3.2.3 Quitosano.

Los biomateriales utilizados en la ingeniería tisular deben de promover la adhesión, proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Para cumplir con ello se requiere que sean tóxicos ni sus productos al degradarse, tampoco deben de generar una reacción inflamatoria ni tener un potencial carcinogénico. Otras características ideales son una buena permeabilidad, propiedades físicas y mecánicas similares al tejido a regenerar, flexibilidad y resistencia. Estos biomateriales pueden ser de origen sintético (metales, polímeros y cerámicas) o naturales (alginato, **quitosano** y colágeno).²⁰

I. Obtención.

El quitosano se obtiene de la quitina, que se considera como el biopolímero más abundante en el mar, se encuentra en los exoesqueletos (caparazones, tendones, capullos), de artrópodos como cangrejos, camarones, langostas y moluscos. También se puede encontrar en paredes celulares de hongos y en la matriz extracelular de una variedad de invertebrados; insectos, platelmintos, esponjas y nematodos.²¹

Se obtiene a partir de una N-Desacetilación; la conversión de más del 60% de los grupos amida de la quitina, y se incrementan los grupos amino (-NH₂), por lo tanto su nombre químico es β-(1-4)2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa.²¹ Se considera más versátil que la celulosa para reacciones químicas por las sustituciones en sitios activos aminos en la posición C2, y varios grupos hidroxilos disponibles.

El proceso químico para obtener el quitosano de la quitina se divide en dos pasos:

1. Se adiciona un grupo hidroxilo a un grupo carbonilo de la función amido, desarrollando cargas iónicas.
2. Se forma una amina por el desprendimiento de ácido acético y se estabiliza la molécula.

El resultado de estos procedimientos es un quitosano insoluble en solventes orgánicos y agua, pero soluble en soluciones ácidas por lo que se considera policationico a pH<6, y puede interactuar con moléculas cargadas negativamente como proteínas, polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos debido a la presencia de grupos amino protonables.^{21, 22} Su procesamiento y grado de desacetilación influyen en la pureza, propiedades fisicoquímicas y mecánicas, peso molecular, y también en el color del quitosano final.^{21, 23,24.}

II. Propiedades Físicas y Químicas.

Tiene como propiedades fisicoquímicas color, viscosidad, reactividad, solubilidad; es biocompatible, biorenovable, no tóxico, biodegradable, antimicrobiano y cristalino; insoluble en pH neutro y básico pero soluble en soluciones acuosas ácidas.^{21, 23, 24.}

El grado de desacetilación (DA), tiene influencia directa en las propiedades fisicoquímicas como la fuerza, solubilidad, viscosidad, porosidad, flexibilidad y conductividad; y en las propiedades biológicas como biodegradabilidad, biocompatibilidad, adsorción, entre otras.

²¹

Hay algunas características importantes durante el proceso de obtención del quitosano que influyen en sus propiedades fisicoquímicas. El peso molecular influye directamente en la viscosidad intrínseca en un medio acuoso, esto a su vez es útil para relacionar la forma y tamaño de las moléculas del polímero en solución y su interacción polímero-disolvente.

^{21, 23.}

III. Usos

Gracias a las diversas investigaciones del quitosano, se han encontrado algunos derivados por diferentes concentraciones de este material que se pueden usar para la preservación de alimentos, (películas protectoras para alimentos, espesante y estabilizador), en biotecnología (como transporte de medicamentos, material genético a través de membranas, microcápsulas y microesferas, como anticoagulante para ayudar en la cicatrización de heridas, se usa en la ingeniería de tejidos para regeneración de hueso y piel), en agricultura como agente antibacterial, en la fabricación de cosméticos, como antioxidante, para la industria textil, entre otros usos.

Como se ha mencionado antes, el objetivo de la ingeniería tisular ósea es reparar o regenerar órganos y tejidos para restaurar su estructura y función haciendo uso de células troncales, biomoléculas y andamios tridimensionales; es importante mencionar la combinación de estos elementos como lo son los andamios funcionalizados con péptidos. El uso de esta combinación se puede justificar con las características del biomaterial utilizado para realizar el andamio junto con su técnica de fabricación que permita además de poseer sus requisitos indispensables, absorber y liberar prolongadamente al péptido por su capacidad de mimetizar las funciones de una proteína completa y su producción significativamente más económica que el uso de estas.

3.2.3 Satín

El satín, también llamado celulosa oxidada regenerada es un hemostático pasivo o mecánico, empleado para intervenir en la hemostasia, ayudando a crear una matriz tridimensional al entrar en contacto con la sangre, para que las plaquetas se puedan adherir y formar el coágulo. Se puede encontrar en forma de una malla y está indicado en cirugías dentales, neurológicas, digestivas, entre otras; la importancia de su uso radica en

disminuir el riesgo de infección por un sangrado incontrolado y a su vez, disminuir el consumo de medicamentos.^{25,26}

3.3 Biomoléculas o factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento son proteínas unidas a receptores celulares que inducen proliferación celular, pueden controlar la actividad de las células troncales para la proliferación o diferenciación de células del mismo tejido o de otros tejidos, así como para inducir la regeneración de tejidos lesionados.

Estos biofactores se dividen en dos categorías, una de ellas induce la transformación celular a osteoblastos y la segunda aumenta la proliferación y actividad de los osteoblastos. La actividad de ambos produce una inducción y modulación de la formación de la matriz ósea y la posterior osificación.

3.3.1 Factores de crecimiento.

Algunos de los factores de crecimiento involucrados en la formación de tejido óseo son los siguientes:

1) BMP. Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son parte de la superfamilia del factor transformante beta (TGF-B), tienen un papel importante en los procesos de embriogénesis, organogénesis proliferación y diferenciación celular. Su importancia en la regeneración ósea se debe a sus funciones osteogénicas así como la capacidad de estimular la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos, además de ayudar a mantener la masa ósea.²⁷

2) PDGF. Es sintetizado por monocitos, macrófagos, células endoteliales y plaquetas. Dentro de sus funciones se encuentra la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos y células mesenquimales, estimula la replicación celular e incrementa la secreción del factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) por parte de los osteoblastos y células mesenquimales.²⁸

3) GM-CSF. Factor estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos. Regula la diferenciación y maduración de células troncales, hematopoyéticas y endoteliales. Además ayuda a promover la angiogénesis.²⁹

4) TGF. Dentro de los TGF, se encuentra el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), sintetizado por osteoblastos, condrocitos y principalmente por plaquetas. Este factor afecta la modulación de la diferenciación hística en el proceso de reparación de fracturas; durante las etapas iniciales se asocia con la proliferación de tejido periosteal.

Otras de las funciones que se le han atribuido al TGF- β es incrementar la proliferación celular, estimular la producción de colágena y con ello estimular la síntesis de matriz extracelular y a su vez inhibir la degeneración.¹⁸

5) IGF. Factor análogo a la insulina. Secretado por hígado y osteoblastos. Su función es estimular la acción y proliferación de osteoblastos además de la síntesis de colágena.¹⁶

6) VEGF. El factor de crecimiento endotelial vascular promueve y regula la proliferación y migración de células endoteliales. En cultivo celulares se ha demostrado su capacidad de inducción de la migración y proliferación de preosteoblastos y en etapas tempranas de la formación ósea promueve la diferenciación de osteoblastos.³⁰

3.3.2 Péptidos.

Los péptidos son cadenas cortas de aminoácidos, la unidad básica de las proteínas. Moléculas señalizadoras con funciones que afectan la regulación de diversos procesos como la vasopresina en respuesta a la hipotensión, o la oxitocina para estimular la secreción de leche durante la lactancia, entre muchos otros procesos.^{31, 32} No poseen estructuras tridimensionales como las proteínas y sus funciones pueden ser estimular, regular o inhibir procesos biológicos y transmitir información a varios tejidos.²¹

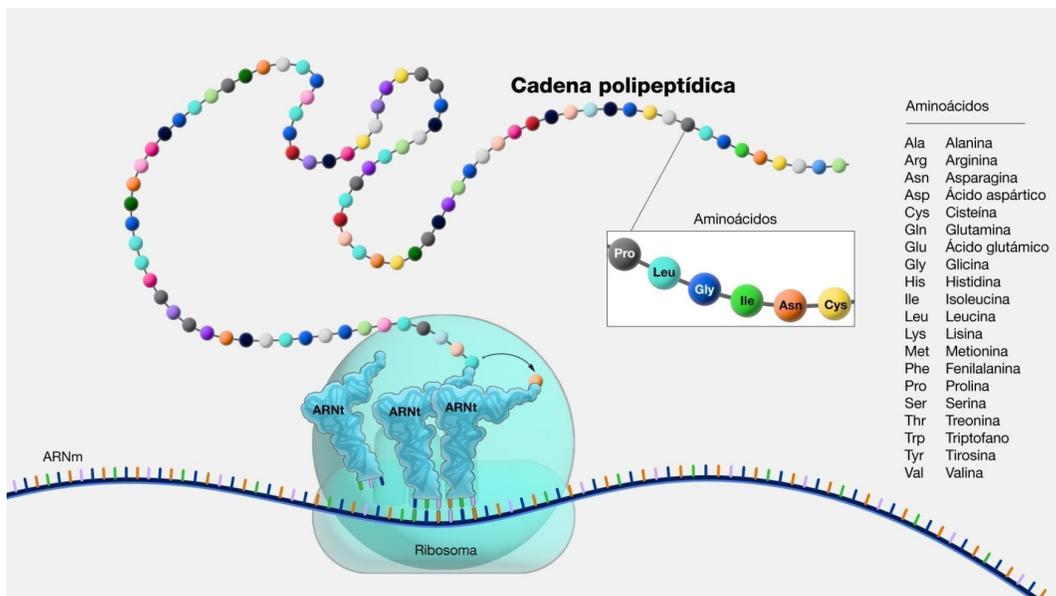


Fig.3) Secuencia de aminoácidos en una cadena polipeptídica para codificar péptidos o proteínas. Imagen tomada del sitio web del National Human Genome Research Institute.

Se han aprobado aproximadamente 60 péptidos por parte de la FDA, y existen otros 600 que están bajo investigaciones y pruebas clínicas.³³ Se pueden sintetizar en grandes cantidades y a bajo costo, en comparación con la síntesis de proteínas, por medio de la

técnica Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS) que permite introducir aminoácidos no nativos y modificaciones post-traduccionales (PTMs) de forma regular, con esta tecnología se ha podido extender la vida media y aumentar la solubilidad de los péptidos.

^{33, 34}

Los péptidos sintéticos (PS) se pueden clasificar de acuerdo a su relación con los péptidos nativos (NP):

1. Análogos. Son modificaciones o sustituciones de NP, cuyas propiedades farmacológicas han sido mejoradas.
2. Nativos. Contienen las mismas secuencias que los NP.
3. Heterólogos. Se descubrieron de bibliotecas sintéticas

El uso de PS proporciona grandes ventajas para los tratamientos puesto que tienen una alta eficacia en humanos, son menos inmunogénicos que proteínas y anticuerpos recombinantes, además de que sus productos al degradarse se transforman en aminoácidos reduciendo los riesgos de toxicidad ya que muy pocos péptidos se acumulan en tejidos. ³³

Su aplicación en la regeneración de tejidos es en combinación con andamios y moléculas bioactivas para inducir procesos y comportamientos celulares. Pueden modificar las propiedades del andamio mejorando la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular. ³³

3.3.3 Proteínas de Cemento.

El cemento es un tejido conectivo duro y avascular que se encuentra en zonas radiculares de los dientes, cuya función es anclar las fibras del ligamento periodontal al diente, además de ayudar a soportar y distribuir cargas masticatorias. Se compone de una parte mineral, aproximadamente el 50%, de hidroxiapatita y una matriz orgánica de colágena tipo I en un 90%, y tipo III en menor cantidad.

Existen dos tipos de cemento que son el cemento celular y acelular. Así también existen dos tipos de proteínas específicas de cemento.

I. CEMP 1 (Proteína de cemento 1).

Es una proteína compuesta por 247 aminoácidos cuya localización se encuentra en el cromosoma 16p13.3. Se expresa en cementoblastos, células del ligamento periodontal y células de vasos sanguíneos en el periodonto. Funciona como regulador de la mineralización por su capacidad de adhesión y diferenciación celular así como nucleación de cristales de HA en estudios in vitro. Su sobreexpresión disminuye la expresión de la proteína de la proteína CAP y de marcadores reguladores como Runx2 y osteocalcina en células del LP. ^{33, 35, 37, 39.}

II. HACD1/CAP (Hidroxiacil coenzima A deshidratasa 1/Proteína de unión al cemento).

Fue la primer proteína específica del cemento radicular humano que se identificó y se aisló; se considera una isoforma de la proteína HACD1 (3-hidroxiacil-CoA-deshidratasa1) que se expresa en músculo cardíaco, esquelético en etapas postnatales y células del folículo dental. La localización cromosómica del gen que codifica a CAP es en 10p13.14. Formada por una serie de 140 aminoácidos, de los cuales 125 se consideran como residuos y corresponden a su porción N-terminal que es idéntica a la de la proteína HACD1.^{33, 35, 36}

Secuencia de aminoácidos de la proteína HACD1/CAP.				
MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG
GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME
KGTHRGLYKS	IQKTLKFFQT	FALLE VSFPS	CCFSIAVIFM	
HACD1 (288 AA)		Isoforma HACD1/CAP (140 AA)		
IVHCLIGIVPT		VSFPSCCFSIAVIFM		

Tabla2. Porción N-terminal. Donde se elimina la secuencia de la proteína HACD1 y se sustituye por la secuencia específica de CAP de 15 AA.

Es una proteína con un peso molecular de 54/67kDa y punto isoeléctrico de 7.78, derivada del splicing alternativo de sustituir la secuencia de aminoácidos (**IVHCLIGIVPT**) de la porción N-Terminal que es idéntica a HACD1, por los 15 aminoácidos (**VSFPSCCFSIAVIFM**) de la secuencia específica de CAP. Su función es inducir la nucleación, regular y direccionar el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita. También regula la diferenciación desarrollo adhesión y migración de células del cemento radicular así como células del ligamento periodontal y hueso alveolar hacia la superficie radicular. Promueve la adhesión y diferenciación de células del folículo dental. Aumenta la actividad enzimática de ALP, y la expresión de proteínas involucradas en el proceso de mineralización.^{33, 36, 37}

a. CAPp5

Se han desarrollado PS derivados de las proteínas del cemento que tienen una actividad biológica en la biomineralización. Uno de ellos es el HACD1/CAPp5, que también posee la capacidad de inhibir la nucleación y crecimiento de cristales minerales.^{33, 35}

CAPp5, es un péptido ácido e hidrofóbico con un punto isoeléctrico de 5.48 y peso molecular de 1.65kDa. De los 15 aminoácidos sustituidos en la porción N-terminal (VSFPSCCFSI**AVIFM**); 10 se consideran hidrofóbicos y 5 hidrofílicos. Es capaz de mimetizar algunas funciones de la proteína completa, por ejemplo su afinidad y promoción de cristales de hidroxapatita. Se ha demostrado que promueve la neoformación de tejido óseo en defectos críticos en calvaria de ratas.^{35, 39.}

Capítulo II Marco Metodológico

2.1 Planteamiento del problema y justificación.

En la actualidad, se han desarrollado diversas alternativas para mejorar la metodología en la terapéutica, incluyendo las características y propiedades en los procedimientos ya establecidos. Específicamente en el área médica y odontológica, numerosas investigaciones se han centrado en el desarrollo de biomateriales y en la búsqueda de nuevas biomoléculas para la regeneración del hueso. El quitosano por ser un biomaterial biodegradable con propiedades hemostáticas y antibacterianas que puede sintetizarse en varias morfologías surge como un buen andamio para la regeneración ósea. Estudios previos en el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados (LBPTM), han demostrado que péptidos biofuncionales derivados de la proteína CAP (HACD1/CAP) tienen la capacidad de regular la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita e inducir el proceso de biomineralización en estudios in vitro e in vivo; por lo cual, este estudio permitirá establecer las bases para un posible uso terapéutico de esta secuencia peptídica combinada con andamios naturales en la regeneración de tejidos mineralizados.

2.2 Pregunta de Investigación.

¿Puede el péptido derivado de CAPp5 en combinación con un andamio de quitosano promover la neoformación de hueso en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas?

2.3 Hipótesis.

El empleo del péptido derivado de CAPp5 en combinación con un andamio de quitosano promueve la formación de hueso en un defecto de tamaño crítico en calvaria de rata.

2.4 Objetivo General.

- Determinar si el péptido CAPp5 en un andamio de quitosano promueve la formación de hueso en un defecto de tamaño crítico en calvaria de rata.

2.5 Objetivos específicos.

- Sintetizar un andamio a partir de quitosano de uso biomédico.
- Realizar el defecto óseo de tamaño crítico en calvaria de ratas.
- Evaluar mediante análisis histológico si el péptido CAPp5 promueve la formación de hueso en un defecto de tamaño crítico en calvaria de rata.

2.6 Universo o muestra.

Los procedimientos, especificaciones técnicas, empleo y cuidado de animales de laboratorio se realizaron de acuerdo a los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, y cuenta con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Odontología (CICUAL-FO-M001-0011-2021).

Se utilizaron de la cepa Wistar, ratas macho de 18 semanas (~250 d de peso), obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Las ratas que se seleccionaron para la investigación se dividieron, aleatoriamente, en dos grupos de 3 animales cada uno:

1. **Grupo Control 1:** Se realizó el defecto de tamaño crítico de 9mm de diámetro + Quitosan + Satín).
2. **Grupo experimental:** se realizó un defecto de tamaño crítico de 9mm diámetro + Quitosano + 20 µg CAPp5 + Satín).

2.6.1 Síntesis del péptido CAPp5

La síntesis del péptido bioactivo derivado de la proteína CAP se llevó a cabo a partir de la técnica de Sheppard para la síntesis de péptidos en fase sólida (Fmoc), el grado de pureza (>90%) se determinó a partir de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); dicha síntesis se solicitó a la casa comercial NEP (New England Peptide).

2.6.2 Caracterización de andamios.

Se preparó una solución de quitosano al 1% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v) y se filtró por una membrana de 0.22 µm. De esta solución, se depositó una cantidad en cajas de 46 pozos y se congelaron a -20°C. Posteriormente se liofilizaron los discos formados. En una campana de flujo laminar, y con ayuda de un sacabocado se obtuvieron los andamios de 9 mm de diámetro.

Se dividieron los discos en dos grupos: 1) grupo control sin péptido y, 2) grupo experimental al cual se le colocaron 20 µg de péptido CAPp5. Los andamios con el péptido se desecaron en una cámara de vacío a temperatura ambiente.

2.6.3 Cirugía en ratas Wistar.

Procedimiento quirúrgico de 6 ratas Wistar macho de 18 semanas de edad, con un peso entre 250 y 300 g, (las ratas se dividieron aleatoriamente en 2 grupos ya mencionados al inicio de la metodología).

Preparación preoperatoria:

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

Instrumental y materiales

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

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

Procedimiento quirúrgico:

1. Se realizó una incisión lineal de 3 cm a través de la piel y el periostio de la calvaria hasta que se expuso el vértice craneal.
2. Se retrajeron tejidos blandos y periostio para obtener una exposición quirúrgica ósea con buena visibilidad durante la trefinación de la calvaria.
3. Se creó el defecto óseo crítico usando de una trefina con un diámetro de 9 mm de diámetro montada en un motor para implantes a 4,000 rpm irrigando constantemente con solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS) para remover detritos.
4. Se realizó el clivaje óseo con ayuda de un cincel, teniendo cuidado para no dañar la duramadre y se lavó la zona con PBS para la remoción de detritos.

5. Se colocaron los andamios previamente confeccionados; para el grupo control un andamio de quitosano y para el grupo experimental un andamio de quitosano más 20µg del péptido CAPp5. Evitando ejercer presión excesiva en el sitio del defecto.
6. Se realizaron puntos continuos para suturar con ácido poliglicólico 4-0.
7. Cuando finalizó la cirugía, se limpió la cabeza con PBS para eliminar restos de sangre. Se transfirió a cada una de las ratas a una incubadora calentada con oxígeno suplementario, se mantuvieron en observación y se transfirieron a jaulas de cría normales (alimentación con ad libitum) hasta la eutanasia.

Eutanasia

Al término del periodo de 4 meses, los animales se sacrificaron con una exposición prolongada de CO₂, hasta llegar al paro respiratorio.

Se realizó la osteotomía de la calvaria en la zona del defecto con una pieza de rotación e irrigación constante de H₂O dd estéril. Se realizó el corte en la periferia del defecto con un margen de 10mm. Se tomó la muestra, se lavó y se fijó con paraformaldehído al 10% durante 24 horas.

Capítulo III. Resultados y análisis de la información obtenida.

3.1 Resultados.

Después de 4 meses de haber realizado el defecto óseo (9mm), en la calvaria de ratas Wistar, se sacrificaron los animales mediante inhalación de CO₂, hasta llegar al paro cardiorrespiratorio; se tomó la muestra de la calvaria y se fijó en formol amortiguado al 10% y ácido nítrico al 5% durante 60 horas. Posteriormente se tiñeron las laminillas con tinción Tricrómica de Masson para obtener los resultados de la regeneración ósea, con un estudio histomorfométrico y un análisis estadístico, la cantidad de hueso regenerado y sus características; cuerpos celulares (osteoblastos, osteocitos, osteoclastos), osteonas, tejido conectivo, vascularización y matriz osteoide.

Para realizar la histomorfometría se realizaron microfotografías a las laminillas teñidas con la técnica Tricrómica de Masson que se procesaron con el software Zen Lite (Carl Zeiss) para calcular las zonas de neoformación ósea.

Histológicamente para el grupo control: Andamio de quitosan + Satín (Fig. 3), en los resultados del estudio al observarse las laminillas, no se encontraron restos del andamio de quitosano lo que significa que se obtuvo una degradación completa del andamio dando lugar a la formación de fibras de colágena tipo I que se pueden observar en gran parte del total de la muestra junto con la presencia de vasos sanguíneos y tejido conectivo.

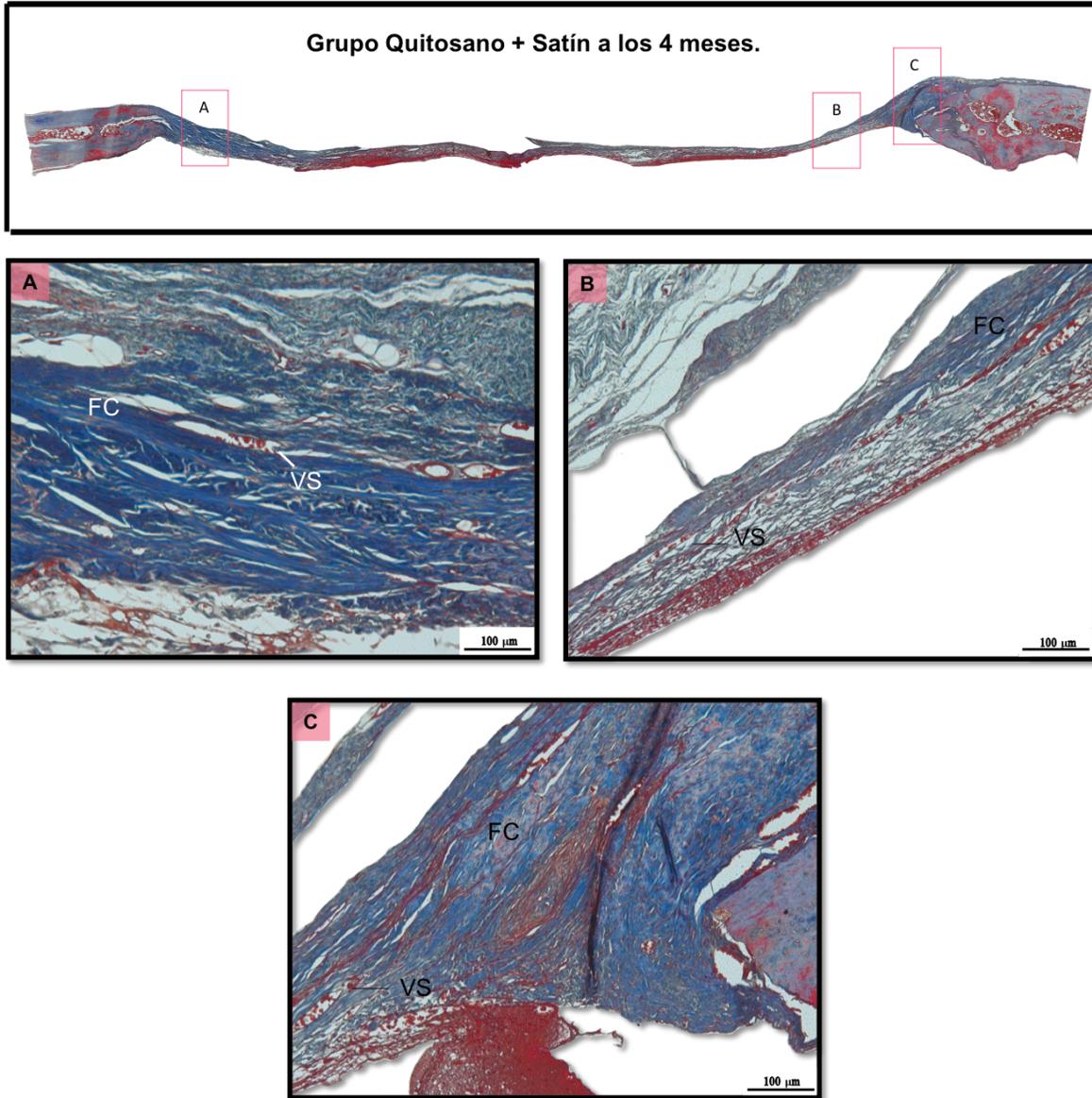


Fig 3. Fotomicrografías (10x) de la reconstrucción panorámica de calvaria de rata del grupo control Quitosano + Satín. A) Se observa teñidas de color azul la presencia de una gran cantidad de fibras de colágena posiblemente de tipo I (FC) dispuestas de forma irregular y vasos sanguíneos (VS). B) Se observa como un tejido conjuntivo muy vascularizado y muy pocas FC. C) Se puede distinguir una mayor presencia de FC en diferentes disposiciones, las fibras de la parte superior se encuentran más organizadas que las fibras de la región inferior, y también se siguen observando una gran cantidad de VS. D) Se observa un tejido con una mayor cantidad de FC con una disposición más homogénea y la presencia de vasos sanguíneos en gran cantidad.

En los resultados del grupo experimental: Andamio con Quitosano + 20 µg Péptido CAPp5 + Satín (Fig.4), se observan componentes celulares propios del tejido óseo en la zona del defecto. Bordes bien delimitados de matriz ósea mineralizada, presencia de osteocitos, osteoblastos, vasos sanguíneos y tejido conectivo. Esto indica que el biomaterial quitosano utilizado como andamio, se reabsorbió con mayor rapidez y adecuadamente sin provocar procesos inflamatorios durante su degradación permitiendo la formación de nuevo tejido óseo, la rapidez de biomineralización de la matriz ósea se puede atribuir al efecto del péptido CAPp5.

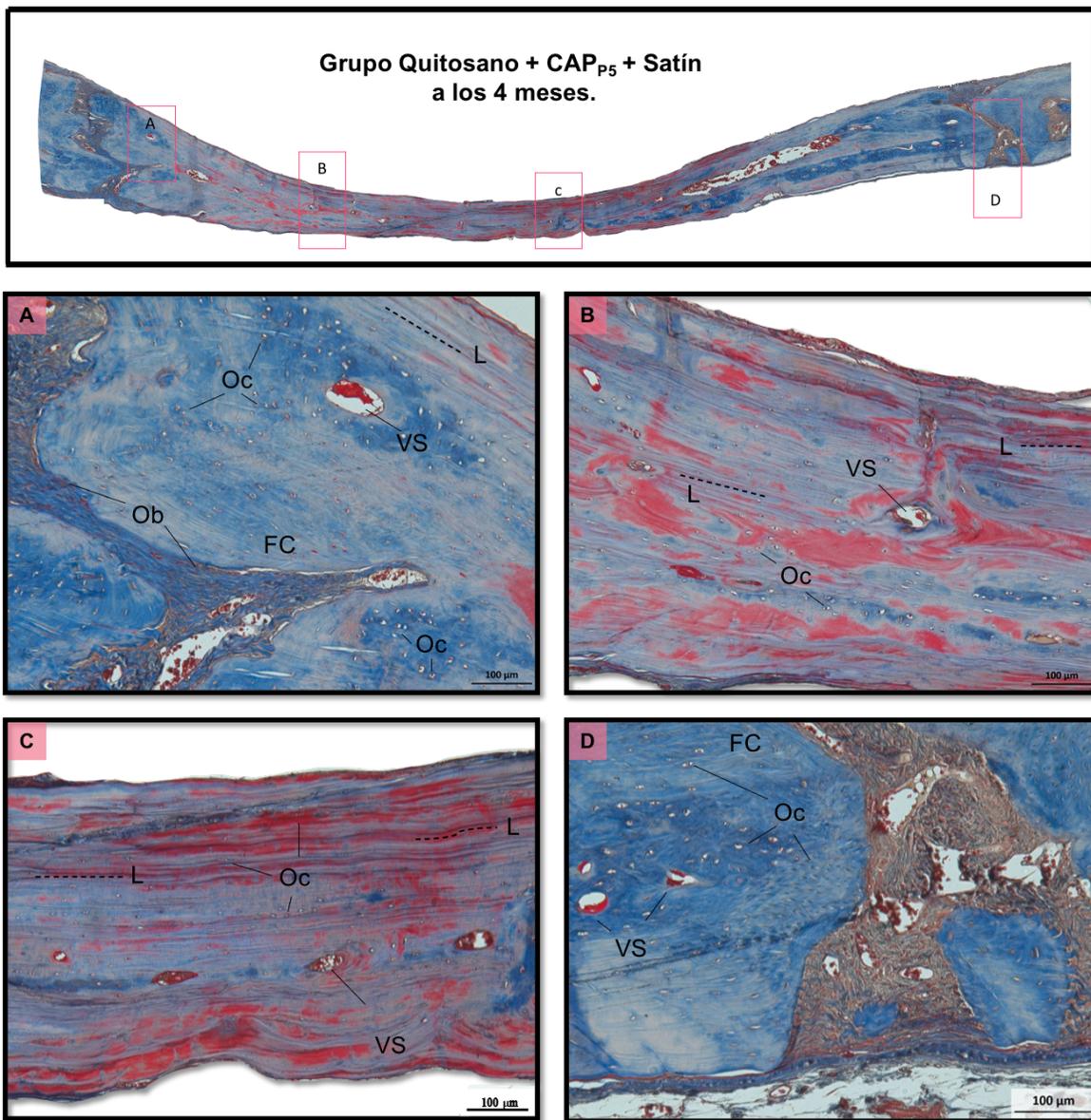


Fig 4. Microfotografías (10x) de la reconstrucción panorámica de calvaria de rata del grupo experimental Quitosano + 20 µg Péptido CAPp5 + Satín. A) Borde del defecto bien delimitado con presencia de

osteoblastos (Ob) y fibras colágena posiblemente de tipo I teñidas de color azul. También se observan osteocitos (Oc) dispuestos en todo el tejido con zonas mineralizadas de coloración roja y marrón y la presencia de conductos de resorción (RC), que albergan vasos sanguíneos e indican un proceso de remodelado óseo activo. En la parte superior del tejido se observan FC con orientación transversal de aspecto laminillar (L) . B) Se aprecian una mayor cantidad de FC muy bien organizadas en forma laminillar (L), elementos celulares como osteocitos presentes en la mayoría de regiones del tejido y posiblemente un conducto de Havers (CH) por la disposición de los osteocitos a laminillas de matriz ósea a su alrededor. C) Se observa el centro del defecto óseo que presenta un tejido con una elevada mineralización en la mayoría de su superficie lo que le da una coloración roja generalizada. Cuenta con Oc, HC, FC de forma laminillar (L) y VS. D) Cerca del borde del defecto se observa una gran cantidad de Oc y también dentro de sus lagunas dispuestos en gran parte de la superficie del tejido, las FC se observan en diferente disposición, las fibras en los extremos superior e inferior se observan más organizadas y por su diferencia de tonalidad se puede deducir que están en diferentes etapas de mineralización, se observan VS en el centro del tejido por lo que se puede considerar un tejido vivo.

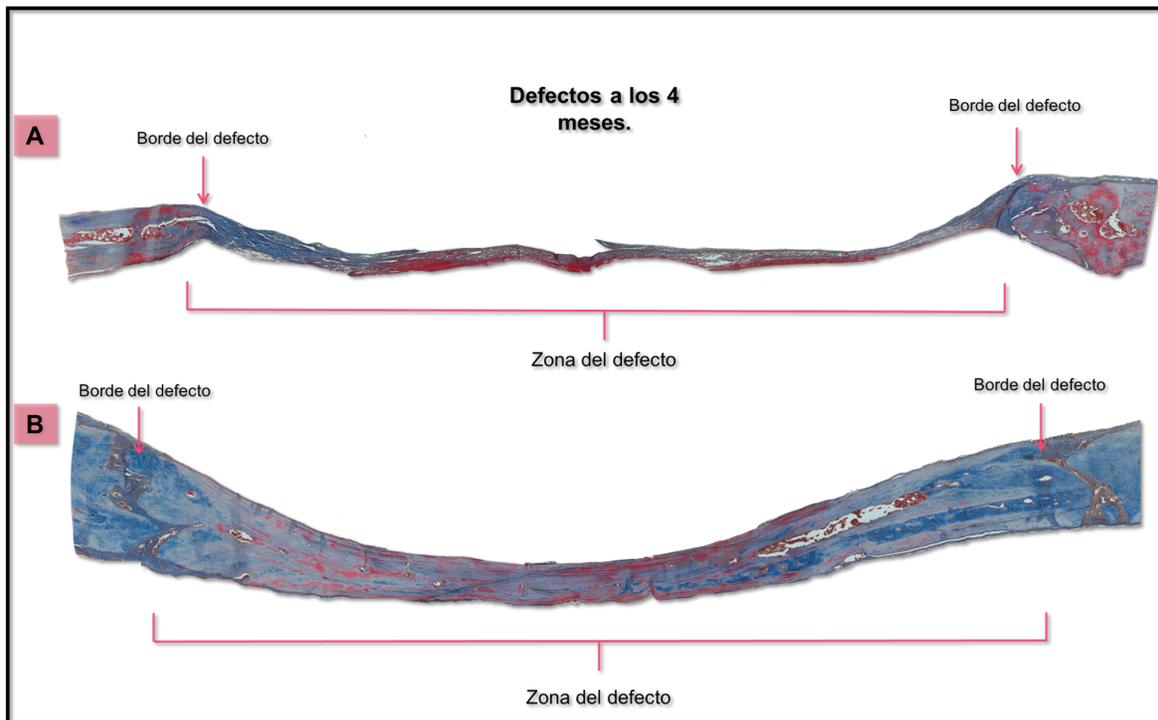


Fig. 5) Microfotografía (10x) de los cortes histológicos de calvaria de rata teñidos con Tricrómica de Masson. A) grupo control: Andamio de Quitosano + Satín. B) grupo experimental: Andamio con Quitosano + 20 µg Péptido CAPP5 + Satín.

3.2 Análisis Estadístico (t-Student).

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism™. En este análisis se demostró una diferencia significativa del 100% del grupo experimental Andamio con Quitosano + 20 µg Péptido CAPp5, respecto al grupo control Andamio de Quitosano + Satín. Comprobando así que el que hubo una neoformación efectiva de tejido mineralizado con el uso de andamios de quitosano funcionalizados con el péptido CAPp5.

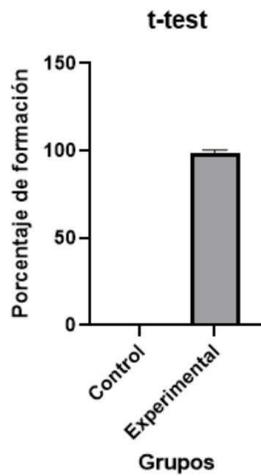


Fig. 6) Gráfica de regeneración ósea con 100% de significancia elevada respecto al control ($p > 0.001$).

3.3 Discusión.

Debido a que el tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo, tiene una capacidad de regeneración por lesiones debido a fracturas, enfermedades sistémicas o infecciones. Sin embargo, cuando el daño excede su capacidad regenerativa se requiere el uso de terapias para restablecer su estructura y función. ^{3,4.}

Una de las técnicas de rehabilitación empleadas es la regeneración ósea donde se utilizan injertos con capacidades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras por medio de autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. Se ha considerado una buena estrategia aunque está limitada a factores como el tamaño del defecto y del injerto, con riesgos de transmisión de enfermedades zoonóticas o virales, infecciones bacterianas o reacciones inmunológicas. ^{4, 14,17}

Es por ello que se han buscado otras alternativas como la ingeniería tisular ósea que se debe considerar como una técnica de relevancia, ya que su objetivo principal es restaurar o sustituir la función de los tejidos dañados, por medio células troncales, andamios y biomoléculas. Además de reducir los riesgos y limitaciones asociados a los injertos empleados en la regeneración ósea, la ingeniería de tejidos aumenta la viabilidad y cantidad de biomateriales para la regeneración y neoformación de tejido óseo. ¹⁵

Debido a los avances tecnológicos, la investigación de cada elemento de la ingeniería tisular se ha seguido desarrollando para poder usarlos en conjunto. Las células troncales se han investigado desde finales del S. XX; son las células troncales adultas las que se emplean en la ingeniería de tejidos y provienen de la médula ósea principalmente, aunque se requieren cultivos celulares para su manipulación. ^{15,18}

En cuanto a los andamios, las características que deben de tener son una superficie grande con una estructura tridimensional, con alta porosidad para permitir la difusión de nutrientes y vascularización, deben ser biocompatibles con características físicas y mecánicas muy similares a las del tejido a reparar ya que su función es permitir la adhesión, diferenciación y migración celular para poder formar tejidos funcionales, y cuyos productos de degradación no sean tóxicos para no generar una respuesta inflamatoria. Estos andamios se pueden fabricar de biomateriales sintéticos o naturales como el quitosano, derivado de la quitina que es uno de los biopolímeros más abundantes. Los métodos de fabricación son muy diversos por ello se debe tener en cuenta el tipo de tejido y grado de daño para su selección; algunas de las técnicas de fabricación son: hilado y tejido de fibras, lixiviación de partículas, espumado con gas, estereolitografía, hidrogeles y bioprinting 3D. ^{18,19, 40.}

Dentro de las biomoléculas que se utilizan en la ingeniería tisular para fabricar andamios biomiméticos podemos encontrar a los factores de crecimiento, que son proteínas que pueden influir en el comportamiento y función celular, induciendo la proliferación o diferenciación y así inducir la regeneración tisular. Algunos de los factores de crecimiento involucrados en la formación de tejido óseo son las BMPs, TGF-B, FGF, VEGF; sin embargo, su participación en el proceso de regeneración se ve limitado por su rápida

eliminación y alta solubilidad. Una alternativa para el uso de estas proteínas son los péptidos sintéticos puesto que pueden estimular, regular o inhibir procesos biológicos así como las proteínas pero con las ventajas de ser más económicos en su producción, son menos inmunogénicos y sus productos no son tóxicos al degradarse; al combinarse con los andamios pueden modificar su estructura para mejorar procesos de adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular.^{20, 15, 33}

En la búsqueda de la mejor opción en técnicas regenerativas se han realizado diversos estudios con diferentes materiales como andamios de PLGA combinados con péptidos RGD. Este biopolímero sintético es favorable para su uso en ingeniería tisular, por sus propiedades mecánicas, biocompatibilidad y biodegradación; sin embargo, tiene ciertas desventajas dependiendo del método de síntesis que se le dé al material en su proceso, en algunos casos no se pueden descartar los riesgos de residuos metálicos o una eliminación incompleta de solvente al producir andamios, y con ello existe una probabilidad de toxicidad para su uso biomédico. Los péptidos de secuencia RGD, por su interacción con integrinas y proteínas de la MEC, se relacionan con procesos de migración y proliferación celular así como de angiogénesis. La combinación de PLGA con péptidos RGD en la regeneración ósea tiene algunas desventajas como la poca especificidad de éste péptido ya que puede interactuar con receptores celulares que no estén involucrados en la regeneración ósea, además de que su administración en el andamio, sumado a factores como equilibrio hidrofóbico/hidrofílico, peso molecular, y cristalinidad propios del polímero, puede intervenir en la tasa de degradación del PLGA que pueden variar de 1 a 2 meses o incluso de 5 a 6 meses, haciendo de este material variable y posiblemente impredecible.^{41, 42, 44, 45.}

Por el lado de los polímeros naturales, se encuentra el alginato, extraído de algas marinas, un biomaterial muy usado para la ingeniería tisular por sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad. Sin embargo, al ser de carácter hidrofílico genera una baja adsorción de proteínas lo que puede provocar que se considere como un material que no genera adhesión celular. En estudios *in vivo*, realizados en el LBPTM, se ha reportado el uso de andamios de alginato combinado con aminoácidos (20 µg/ml de Ácido Glutámico + 20 µg/ml de Fenilalanina) logrando un porcentaje de regeneración ósea del 75%. Mientras que la combinación de quitosano con una secuencia de 5 aminoácidos (AVIFM), en una concentración de 20 µg, promueve la regeneración del 100% del defecto a las 16 semanas.^{47-49.}

El quitosano por sus propiedades fisicoquímicas; alta porosidad, solubilidad en medios ácidos, sus propiedades de biocompatibilidad como su degradación paralela al tiempo de regeneración, su no toxicidad y su capacidad de degradación por lisozimas gastrointestinales y bacterias del colon, lo hace un material muy versátil para la síntesis de diferentes tipos de andamios como hidrogeles o nanofibras, ya que el quitosano con un grado de desacetilación cercano al 100% tiene una alta tasa de degradación y afinidad de adhesión celular, además de tener una mayor biocompatibilidad celular.^{42, 45, 50-52}

Al ser el un biopolimero policationico podría generar interacciones hidrofóbicas con biomoléculas apolares como lo es el péptido CAPp5, actuando como un vehículo que genera la liberación prolongada de está biomolécula, aunado a la capacidad de CAPp5 de mimetizar funciones de la proteína completa, como afinidad y promoción de cristales de hidroxiapatita y a demás promueven la neoformacion controlada de tejido óseo en defectos críticos en calvaria de rata.^{34-39, 50-52}

3.4 Conclusiones.

Con base en los datos obtenidos a partir la observación de las microfotografías de las laminillas y el análisis estadístico, se puede determinar que el grupo experimental de Quitosano + Péptido CAPp5 , tuvo mejores resultados para la neoformación ósea ya que en los 4 meses que duró el estudio, se logró formar nuevo tejido óseo con las características adecuadas por los elementos celulares (osteocitos y osteoblastos), con la observación histológica se podría considerar un tejido vivo por la presencia de vasos sanguíneos en cantidad suficiente para tener una buena irrigación.

El efecto del péptido CAPp5 en los defectos de tamaño crítico generó las condiciones adecuadas para la neoformación de matriz ósea y la aceleración de su mineralización. Sin embargo, en ambos grupos se alcanzó la degradación completa de los andamios de quitosán sin presencia de respuesta inflamatoria a sus productos de degradación.

Estos resultados nos indican que los andamios de quitosán combinados con el péptido CAPp5 empleados en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata promueven la neoformación de hueso.

Referencias bibliográficas.

1. Caddeo, S., Boffito, M., & Sartori, S. (2017). Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5. doi:10.3389/fbioe.2017.00040
2. Khademhosseini, A., & Langer, R. (2016). A decade of progress in tissue engineering. *Nature Protocols*, 11(10), 1775–1781. doi:10.1038/nprot.2016.123
3. Brüel Annemarie, Christensen Erik, Qvortrup Klaus, Trandum/Jensen Jorgen, Geneser Finn. *Geneser Histología*. 4ta edición. México, D. F, Editorial Médica Panamericana (2014): 261-272, 274-281.
4. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E47-51
5. Levasseur. R., *Fisiología del tejido óseo*. EMC - Aparato Locomotor. 2019;52(2):1-25.
6. Heng, Boon & Bai, Yunyang & Li, Xiaochan & Meng, Yanze & Lu, Yanhui & Zhang, Xuehui & Deng, Xuliang. The bioelectrical properties of bone tissue. *Animal models and experimental medicine*. 2023;00:1-11. doi:10.1002/ame2.12300
7. Xinyu Song, Ling Xu, Wenjie Zhang, Biomimetic synthesis and optimization of extracellular vesicles for bone regeneration, *Journal of Controlled Release*. 2023;355:18-41. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.057>
8. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. *Histología Texto y Atlas, Correlación con biología molecular y celular*. 7a edición. Barcelona, España. Wolters Kluwer. 2016; 233-264
9. *Histología del hueso y cartílago y su relación con la colocación de implantes*. Ana Lucía Martínez Leyton. Diciembre 2006. México D. F.
10. Lecuona Rodríguez Miguel A., Guerrero Álvarez Alejandra, Zarco Ordóñez Karla. *Notas de histología*. 3A Edición. Facultad de Medicina.
11. Almaguer Flores Argelia, Villagómez Olea José Guillermo. *Ecología Oral*. 1a edición. México, Ciudad de México. Manual Moderno (2018): 38-41, 48.
12. Ronner Peter. *Netter Bioquímica esencial*. 1 ed. Elsevier. (2019): 353-377.
13. CD. Gonzalo Montoya Ayala. Tesis: La proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización in vitro. 2011
14. Martínez Álvarez O, Barone A, Covani U, Fernández Ruíz A, Jiménez Guerra A, Monsalve Guil L, Velasco Ortega E. Injertos óseos y biomateriales en implantología oral. 2018; 34(2):111-119.

15. Curberlo Sofia, Meneses Romina, Pereira-Prado Vanesa, Tapia Gabriel. Regeneración ósea como un ejemplo de ingeniería tisular en odontología, con énfasis en el desarrollo de los andamios. *Odontoestomatología*. Vol XXII - N°36/Julio - Diciembre 2020. 74-86.
16. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling procesos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E151-7
17. Taty Díaz, J.M Pérez Sánchez, J. Ribera Zabalbeascoa, J.A Cordero Fernández, M.Mella Sousa. Sustitutos óseos. *Rev.S.And.Traum.y Ort.*, 2008;26(1/2):2-13.
18. Marta Miranda Maribel, Vázquez Zapién Gustavo J, Sánchez Monroy Virginia. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*. Vol. 27. Núm. 3. Mayo 2012.194/199.
19. Sabino Marcos A, Loaiza Marielys, Dernowsek Janaína, Rezende Rodrigo, Da Silva Jorge. Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Rev LatinAM. Metal. Mat.* 2017;37(2):8-25.
20. Serrato Ochoa Deyanira, Nieto Aguilar enato, Aguilera Méndez Asdrúbal. Ingeniería de tejidos. Una ueva disciplina en medicina regenerativa. *Investigaciei[n y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 2015 : 64;61-69.
21. Rafael Santiago I, Beltran Condenzo T, Aguirre Morales A. Uso de células madre mesenquimales para la regeneración ósea guiada en el ámbito odontológico: una revisión. *KIRU*. 2021;18(3):187-193.
22. Ahmed Shakeel, Ikram Saiqa. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achievements in the life sciences*. 2016;10:27-37.
23. Romero Serrano Allied, Pereira Juan. Review. Chitosan, a verasátil biomaterial. State of The art from its obtaining to its múltiple applications. *Revista ingeniería UC*. 2020;27(2):118-135.
24. Giraldo Pedraza, Juan. (2015). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del Quitosano. 10.13140/RG.2.1.3350.9287.
25. Arévalo Bernabé Angel Guillermo, Juárez Giménez Juan Carlos, Lalueza Broto Pilar, Gorgas Torner Maria Queralt. Hemostáticos tópicos, revisión y sistematización. 2019. Disponible en: https://gruposdetrabajo.sefh.es/gps/images/stories/publicaciones/PAM_2020_435_860-865_-Hemostaticos-topicos.pdf
26. Romero Crespo I, Mora Herrera C, Quirante Cremades A, López Sánchez P, Gaspar Carreño M, Achau Muñoz R. Agentes hemostáticos tópicos de uso quirúrgico. *Rev. OFIL-ILAPHAR* 2021; 31(1):79-98. DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1699-714X20210001000016>

27. Zhu Liwei., Liu Yuzhe, Wang Ao, Zhu Zhengqing, Li Youbin, Zhu Chenyi, Che Zhnejia, Liu Tengyue, Liu He, Huang Lanfeng. Applications of BMP in Bone Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10;1-25.
28. Filipowska., J., Tomaszewski, K. A., Niedźwiedzki., L., Walocha, J. A, & Niedźwiedzki, T. The role of vasculature in bone development, regeneration, ad proper systemic functioning. *Angiogenesis* 2017;20(3):291-302.
29. Definición de GM-CSF-Diccionario de cáncer del NCI-NCI cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/gm-csf
30. Bravo B, Fernández de Castro, L. Buen día, I. Santos, X. Gortázar A. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el fragmento N-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) regulan la proliferación de células madre mesenquimales humanas. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2017;9(1):5-12.
31. Mckee Trudy, Mckee James R. *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida*. 4ta edición. México, CDMX. Editorial MC Graw-Hill / Interamericana de México. (2014): 139-140.
32. National Human Genome Research Institute. (<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Peptido>).
33. Bermúdez am, Hoz L, Montoya G, nidome M, Pérez- Soria A, Romo E, Soto-Barreras U, et al. Bioactive synthetic peptides for oral tissues regeneration. *Frontiers in materials*.23 April 2021
34. CD. Gonzalo Montoya Ayala. Tesis: Estudio de cristales inducidos con el Péptido de la proteína de adhesión al cemento radicular (CAP) en un sistema libre de células ".
35. Ureiro Cueto Guadalupe del Carmen. Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la funcionalización de superficies de titanio y óxido de titanio. 2020
36. Sosa Serrano Ali Israel. Efecto de un péptido sintético bioactivo derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) En un modelo de lesión de médula espinal en ratas. 2020.
37. Barrios López Kevin. Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la formación y crecimiento de oxalato de calcio e hidroxiapatita. 2018.

38. González Alva Patricia, Gómez Plata Eduardo, Arzate Higinio. Localización de las proteínas específicas del cemento radicular CEMP1 y CAP en células neoplásicas. *Journal of Oral Research*. 2013; 2(1): 11-17.
39. Hernández Cortés Sinaí. Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. 2016.
40. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML, Tissue engineering and regenerative medicine: history, progresos, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403-430.
41. Bellis, S. L. (2011). Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), 4205–4210. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.029
10.1016/j.biomaterials.2011.02.029
42. Giuliani, A., Mazzoni, S., Manescu, A., & Tromba, G. (2019). Interactions between tissues, cells, and biomaterials: an advanced evaluation by synchrotron radiation-based high-resolution tomography. *Materials for Biomedical Engineering*, 1–34. doi:10.1016/b978-0-12-816901-8.00001-8
43. Lordache, F. (2019). Bioprinted scaffolds. *Materials for Biomedical Engineering*, 35–60. doi:10.1016/b978-0-12-816901-8.00002-x
44. Benatti, A. C. B., Pattaro, A. F., Rodrigues, A. A., Xavier, M. V., Kaasi, A., Barbosa, M. I. R., ... Kharmandayan, P. (2019). Bioreabsorbable polymers for tissue engineering: PLA, PGA, and their copolymers. *Materials for Biomedical Engineering*, 83–116. doi:10.1016/b978-0-12-816901-8.00004-3
45. Ahmad, H., Arya, A., Agrawal, S., & Dwivedi, A. K. (2019). PLGA scaffolds: building blocks for new age therapeutics. *Materials for Biomedical Engineering*, 155–201. doi:10.1016/b978-0-12-816901-8.00006-7
46. Valarezo Ulloa María José. Estudio de la degradación del poli (ácido-l-láctico-co-glicólico), para la dosificación de Everolimus en medio dinámico. 2015.
47. Mollah MZI, Zahid HM, Mahl Z, Faruque MRI, Khandaker Mu. The usages and potential uses of alginate for healthcare applications. *Front.Mol Biosci*. 2021; 8(719972): 1-12. doi: 10.3389/fmolb.2021.719972
48. Neve MI, Moroni I, Barrias CC. Modulating alginate hydrogels for improved biological performance as cellular 3D microenvironments. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2020; 8 (665): 1-16. doi: 10.3389/fbioe.2020.00665.
49. Scherling Ocampo Astrid Lucero. Andamios funcionalizados con aminoácidos como medios inductores de la regeneración ósea. 2020.

50. Batista, R. A., Otoni, C. G., & Espitia, P. J. P. (2019). Fundamentals of chitosan-based hydrogels: elaboration and characterization techniques. *Materials for Biomedical Engineering*, 61–81. doi:10.1016/b978-0-12-816901-8.00003-1
51. Qasim, S. B., Husain, S., Huang, Y., Pogorielov, M., Deineka, V., Lyndin, M., ... Rehman, I. U. (2017). In- vitro and in -vivo degradation studies of freeze gelated porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer Degradation and Stability*, 136, 31–38. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.018
52. Kim Y, Zharkinbekov Z, Raziyeva K, Tabyldiyeva L, Berikova K, Zhumagul D, et al. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration. *Pharmaceutics* [Internet] 2023;15(3):807. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15030807>