



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA *IN VITRO* DE  
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE RATA SOBRE  
UN SISTEMA INYECTABLE DE QUITOSANO  
FOTOSENSIBLE CON HIDROXIAPATITA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central  
de Venezuela, por la Bachiller Kruzkaya  
Márquez Reyes, como requisito parcial para  
optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dr. José F. Álvarez Barreto.  
Asesora académica: Dra. María valentina Salas.

CARACAS, VENEZUELA

Octubre, 2013



Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Dirección

## CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 06/11/2013, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller **Márquez R. Kruzkaya José M.**, titular de la cédula de identidad No. 16.870.303; titulado: **“Diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre mesenquimales de rata sobre un sistema inyectable de quitosano fotosensible con hidroxapatita”**; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los siete días del mes de noviembre del año dos mil trece.

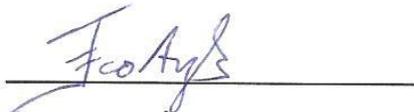
  
Dr. Jesús Guillermo Romero Muñoz  
Presidente de  
Consejo de la Escuela de Biología

JGR/br.-

Acta del Examen Público y Solemne del Trabajo Especial de Grado de la  
Bra. Kruzkaya Márquez Reyes

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias y la Ilustre Universidad Central de Venezuela, damos fe que examinamos el Trabajo Especial de Grado de la Bachillera Kruzkaya Márquez Reyes, C.I. 16.870.303, titulado "**Diferenciación Osteogénica *in Vitro* de Células Madre Mesenquimales de Rata sobre un Sistema Inyectable de Quitosano Fotosensible con Hidroxiapatita**", el cual es requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología, mención Biología Celular. Culminada la evaluación, consideramos que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, por lo cual ha sido **APROBADO**, y calificado con la puntuación de **18 puntos**. Así mismo, proponemos que sea considerado para optar a **MENCIÓN HONORÍFICA** ante el Consejo de Escuela.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 14 días del mes de octubre del año 2013



Dr. José Álvarez Barreto

Tutor



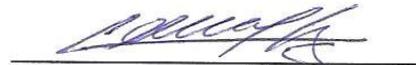
Dra. María Valentina Salas

Asesora académica



Dra. Elizabeth Merentes

Jurado



Dra. Concepción Hernández

Jurado

## DEDICATORIA

*Quiero dedicarle este trabajo a las personas más importantes en mi vida, mi familia, en especial a mi mamá Rosa y hermano por todo su amor y apoyo que he recibido de ellos cada día. Enseñándome que no existe límites para el cumplimiento de mis sueños*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y María, por jamás abandonarme y ser el pilar de apoyo y permitirme llegar a este punto, dándome las fuerzas para superar todos los obstáculos.

A mis padres, Rosa y Francisco, quienes con su esfuerzo, amor incondicional, comprensión y apoyo, me han permitido realizar mis sueños. En especial a mi mamá que nunca ha dudado de mí, a ustedes mil gracias.

A mi hermanito Francisco, quien me ha dado siempre su amistad, por su honestidad, lealtad y su protección ante todo.

A mi familia, por enorgullecerse de mis éxitos como si fueran propios, mis tíos y tías, en especial a mi abuela Victoria que siempre está dispuesta a escucharme, llenándome de amor y fortaleza.

A mi abuelo Rafael, que a pesar de no encontrarse ya con nosotros sé que siempre me ha cuidado, y sé que está orgulloso de mí.

A mi tutor, el Dr. José Álvarez, quien ha sido mi guía en este camino de aprendizaje tanto profesional como personal. Por su dedicación, apoyo y comprensión. Por darme la oportunidad que me permite optar el título de licenciada al abrirme las puertas de su laboratorio y al mundo de las investigaciones científicas. Gracias por tenerme paciencia, creer en mí y confiar en mis decisiones.

A todas y cada una de las personas que me han acompañado en mi experiencia en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos Humanos; gracias por hacerme sentir en casa. A mis compañeros de laboratorio, por todo lo enseñado, Norkis, Mariangela, Eliana, Luisiana, Andreina, Luis, Maury y Dubrasvka.

A las profesoras, Valentina Salas, Elizabeth Merentes y Concepción Hernández por su dedicación en la revisión del trabajo y su disposición de ayudarme en esta etapa.

A cada uno de los profesores que han estado en mi carrera y me han ayudado de manera personal y profesional. En donde cada uno de ellos tuvo un papel importante.

A mis amigos que me han acompañado en los momentos más importantes de mi carrera. Los cuales aprendí a quererlos como si fueran parte de mi familia. Marlene, Mitzie, Armando, Ingrid Márquez, Ingrid Botero, Ygrein, Grecia, Astrid, y como olvidarme de Francisco Marichal (el gallego). Gracias chicos nunca me olvidare de ustedes ya que tienen un espacio en mi corazón.

Al IDEA por permitirme la realización de este trabajo. Y no puedo olvidarme de la Facultad de Ciencias, mi segundo hogar, y la escuela de Biología, ya que fue en sus aulas y pasillos donde me prepararon para ser una profesional, con las herramientas y adiestramiento que me permitieron querer a mi carrera mucho más.

## Resumen

En los últimos años se ha desarrollado la ingeniería de tejidos, un campo interdisciplinario, el cual combina conocimientos de la biología con la tecnología de los materiales y de la ingeniería; basándose en el estudio y aplicación de los procesos de reparación de tejidos para la creación de implantes, sobresaliendo tres elementos principales: las matrices porosas tridimensionales (biomateriales), las moléculas bioactivas que van a modular la actividad celular, y el componente celular en donde se pueden utilizar células diferenciadas o progenitoras, siendo el caso de las células madre. Las células madre mesenquimales han sido ampliamente utilizadas en la ingeniería de tejido óseo, debido a su gran plasticidad, y capacidad proliferativa y de diferenciación.

En la regeneración de tejido óseo, se ha utilizado biomateriales sintéticos y de origen natural que permiten la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como el crecimiento y remodelación tisular. El quitosano, un polímero natural biodegradable derivado del citoesqueleto de crustáceos, ha demostrado ser biocompatible y aprovechable en una amplia gama de aplicaciones biomédicas. Una de las formas de utilización de quitosano es por medio de los hidrogeles que son cadenas poliméricas entrecruzadas que tienen la capacidad de absorber agua. Los hidrogeles de quitosano han demostrado un efecto beneficioso en la condrogénesis y osteogénesis tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

Otro material de interés en este estudio es la hidroxiapatita, la cual es el componente inorgánico principal de los tejidos óseos; este material ha sido utilizado en una gran gama de aplicaciones biomédicas, debido a su alto grado de biocompatibilidad y bioactividad.

Por estas razones el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial osteogénico *in vitro* de un sistema inyectable de quitosano e hidroxiapatita, utilizando células madre mesenquimales (MSC) de la médula ósea de ratas; cultivadas durante 21 días, sobre los hidrogeles de quitosano: hidroxiapatita (QT: HAP). El quitosano fue modificado químicamente, a través de reacciones de carbodiimida, con ácido lactobiónico y ácido azidobenzoico para hacerlo soluble a pH fisiológico y fotosensible, respectivamente. Se hicieron hidrogeles por mezcla de quitosano modificado e hidroxiapatita en diversas proporciones (100:0, 90:10, 70:30, 50:50 y 30:70) y exponiéndolas a luz UV. Se determinó la proliferación celular en medio alfa-MEM y osteogénico, la diferenciación osteogénica de las MSC a través de la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina, mostrando mayor actividad de esta enzima en medio osteogénico que los obtenidos en medio alfa-MEM. La deposición de calcio mostro valores dentro del rango de los esperados.

Adicionalmente se realizó microscopia confocal para evaluar la morfología celular, así como las interacciones células-hidrogel. Los resultados demostraron una buena interacción célula-biomaterial, con un proceso de diferenciación que comienza poco después del sembrado de las células (antes de los 4 días de cultivo).

En general, este trabajo demostró que los hidrogeles propuestos, permiten la proliferación celular y diferenciación osteogénica *in vitro* que depende de la composición de los mismos, destacando la composición 70:30 con quitosano de bajo peso molecular. Se propone futuras investigaciones de este sistema, en cuanto a las interacciones de los biomateriales así como estudios *in vitro* e *in vivo*; y su subsecuente desarrollo en la regeneración de tejido óseo.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Hueso .....	1
1.1.1. Estructura y función .....	1
1.1.2. Formación y remodelación .....	2
1.1.3. Tipos de células .....	3
1.2. Patologías óseas .....	4
1.3. Terapias actuales para el tratamiento de lesiones óseas .....	5
1.3.1. Implantes metálicos .....	7
1.3.2. Implantes cerámicos .....	8
1.4. Ingeniería de tejido óseo .....	8
1.5. Células madre mesenquimales (MSC) .....	9
1.6. Biomateriales .....	13
1.6.1. Polímeros .....	14
1.6.2. Quitosano (QT) .....	17
1.6.3. Hidroxiapatita (HAP) .....	18
2. ANTECEDENTES .....	20
3. OBJETIVOS .....	24
3.1. Objetivo General .....	24
3.2. Objetivos Específicos .....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
4.1. Elaboración de los hidrogeles de quitosano .....	25
4.1.1. Solubilización del quitosano (QT) .....	25
4.1.2. Modificación química con ácido lactobiónico (LA) (QT-LA) .....	25
4.1.3. Modificación química con ácido 4- azidobenzoico (Az) (Az-QT-LA) .....	25
4.10. Análisis estadístico .....	33
4.2. Construcción de los Hidrogeles de Quitosano-Hidroxiapatita (QT-HAP) .....	26
4.3. Aislamiento y cultivo de las células madre mesenquimales de médula ósea de rata (MSC) .....	27
4.4. Cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea de rata .....	28
4.5. Sembrado de las MSC en los hidrogeles de quitosano e hidroxiapatita .....	29
4.6. Determinación del número de células adheridas a los hidrogeles. Cuantificación del ADN .....	30
4.7. Determinación de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) .....	31
4.8. Determinación de la deposición de calcio en los hidrogeles .....	31
4.9. Evaluación de la morfología celular .....	32
5. RESULTADOS .....	34
5.1. Modificación química del QT .....	34
5.2. Construcción de los hidrogeles QT: HAP .....	35
5.3. Cultivo de Células Madre Mesenquimales de Médula Ósea de Ratas .....	40
5.4. Proliferación Celular .....	41
5.5. Actividad de la Fosfatasa Alcalina (ALP) .....	47
5.6. Deposición de Calcio .....	52
5.7. Evaluación de la Morfología Celular .....	57
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	65

6.1. Modificación química del QT .....	66
6.2. Construcción de los hidrogeles QT: HAP .....	69
6.3. Cultivo de células madre.....	71
6.4. Proliferación celular.....	72
6.5. Diferenciación osteogénica.....	77
6.6. Evaluación de la Morfología Celular .....	81
7. CONCLUSIONES.....	85
8. RECOMENDACIONES.....	87
9. BIBLIOGRAFÍA .....	88
10. APENDICES .....	101
10.1. Medios y soluciones preparadas en el laboratorio para el cultivo celular.....	101
10.1.1. Medio Nutritivo Alfa-MEM ( $\alpha$ -MEM) (Cantidades necesarias para preparar 1000 mL) .....	101
10.1.2. Solución Buffer de Fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio (Cantidades necesarias para preparar 1000 mL).....	101
10.1.3. Dexametasona ( $1 \cdot 10^{-8}$ ).....	102
10.1.4. Medio Osteogénico (Cantidades necesarias para 1000 mL) .....	102
10.2. Soluciones utilizadas para preparar los andamios.....	103
10.2.1. Ácido Clorhídrico (HCl) (2M), cantidades necesarias para preparar 40 mL .....	103
10.2.2. Solución de quitosano (QT) 1,5 % p/v, cantidades necesarias para preparar 400 mL.....	103
10.3. Soluciones de laboratorio para llevar a cabo, los ensayos para determinar la diferenciación osteogénica .....	103
10.3.1. Ácido Acético (1N), cantidades necesarias para preparar 200 mL .....	103
10.4. Soluciones para el marcado celular.....	104
10.4.1. Solución de Albumina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS, cantidad necesaria para preparar 10 mL .....	104
10.4.2. Triton X-100 al 0,1%, cantidades necesarias para preparar 50 mL .....	104
10.4.3. Falotoxina Fluorescente (BODIPY FL), cantidad necesarias para 600 $\mu$ l.....	104
10.5. Curvas patrón de los ensayos realizados .....	105
10.5.1. Curvas patrón para la cuantificación de la cantidad de ADN en los andamios. Ensayo de proliferación. Primer ensayo.....	105
10.5.2. Curvas patrón para la cuantificación de la cantidad de ADN en los andamios. Ensayo de proliferación. Segundo ensayo.....	105
10.5.3. Curvas patrón para la determinación de la actividad de la enzima ALP. Diferenciación osteogénica .....	106
10.5.4. Curvas patrón para la determinación de la deposición de Calcio. Diferenciación osteogénica .....	106
10.6. Formulaciones para cálculos realizados para los distintos ensayos .....	107
10.6.1. Ensayos de proliferación de ADN .....	107
10.6.2. Determinación de la Actividad Fosfatasa Alcalina.....	107
10.6.3. Determinación de la deposición de calcio.....	107
10.6.4. Determinación de cantidad de calcio presente en los hidrogeles QT: HAP.....	108
10.7. Imágenes de MSC sin diferenciar y de células osteoblásticas .....	108
10.7.1. Células Madre Mesenquimales sin diferenciar .....	108
10.7.2. Células Osteoblásticas maduros en cultivo .....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Diferenciación de células madre mesenquimales en múltiples linajes mesodérmicos.....	11
<b>Figura 2.</b> Estructuras químicas de macrómeros utilizados para la preparación de hidrogeles por polimerización de radicales.....	16
<b>Figura 3.</b> Estructura del quitosano.....	17
<b>Figura 4.</b> Estructura química foto-entrecruzable de AZ-QT-LA.....	20
<b>Figura 5.</b> Esquema de placa de 24 pozos para los diferentes ensayos de cultivo de MSC.....	29
<b>Figura 6.</b> Hidrogeles de QT: HAP (100:0, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90).....	39
<b>Figura 7.</b> Células madre mesenquimales de médula ósea de rata.....	40
<b>Figura 8.</b> Gráfico de proliferación celular. Segundo ensayo.....	46
<b>Figura 9.</b> Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en el tiempo.....	49
<b>Figura 10.</b> Concentración de P-Nitrofenol en cada una de las composiciones bajo las diferentes condiciones de cultivo.....	51
<b>Figura 11.</b> Gráficas de deposición de calcio en el tiempo.....	54
<b>Figura 12.</b> Gráficas de cantidad de calcio en el tiempo con el valor teórico de calcio presente en cada una de las composiciones.....	56
<b>Figura 13.</b> Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 4, utilizando QT de peso molecular medio, a diferentes composiciones.....	58
<b>Figura 14.</b> Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 10, utilizando QT de peso molecular medio, a diferentes composiciones.....	59

<b>Figura 15.</b> Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 16, utilizando QT de medio peso molecular, a diferentes composiciones.....	60
<b>Figura 16.</b> Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 21, utilizando QT de medio peso molecular, a diferentes composiciones.....	61
<b>Figura 17.</b> Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 4, utilizando QT de peso molecular bajo, a diferentes composiciones.....	62
<b>Figura 18.</b> Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 10, utilizando QT de peso molecular bajo, a diferentes composiciones.....	63
<b>Figura 19.</b> Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 16, utilizando QT de peso molecular bajo, a diferentes composiciones.....	64
<b>Figura 20.</b> Esquema de la reacción química de la carbodiimida.....	66
<b>Figura 21.</b> Ruta de la síntesis del quitosano modificado con azida.....	68
<b>Figura 22.</b> Esquema de la conjugación de quitosano con azida utilizando la química de carbodiimida con EDC como medidor.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Métodos de obtención de quitosano/hidroxiapatita, y sus formulaciones.....	22
<b>Tabla 2.</b> Características de las soluciones de quitosano a concentraciones de 1% p/v y 2% p/v en agua destilada y PBS.....	35
<b>Tabla 3.</b> Características de los hidrogeles de QT formados, tanto con agua destilada como con PBS a diferentes tiempos de exposición de luz UV, con una intensidad 5000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ .....	36
<b>Tabla 4.</b> Hidrogeles formados con las distintas mezclas QT: HAP, en agua destilada, a 5000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ , durante 3 min de exposición.....	38

## LISTA DE ABREVIACIONES

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ALP:** Fosfatasa Alcalina

**ANOVA:** Análisis de Varianza

**Anti-Anti:** Antibiótico - Antimicótico

**Alfa-MEM/ $\alpha$ -MEM:** Medio Mínimo esencial alfa (en inglés, alpha minimum essential media)

**AZ:** ácido 4-azidobenzoico

**$\beta$ -GP:**  $\beta$ - glicerofosfato/ beta-glicerolfosfato

**BSA:** Albumina Sérica Bovina

**BPM:** Peso molecular bajo

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de Calcio

**CD29:** Marcador  $\beta$ 1-Integrina

**CD34/CD45:** Marcador de Superficie de Células Hematopoyéticas.

**CD44:** Marcador de Superficie célula-célula, receptor ácido hialurónico y otros ligandos

**CD271:** Marcador de Superficie para células madre mesenquimales

**DMEM:** Medio Eagle modificado de Dulbecco

**DO:** Densidad Óptica

**EDC:** N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-Clorhidrato de Etilcardimida

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**FTRI:** Espectrometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier

**HAP:** Hidroxiapatita

**HCl:** Ácido Clorhídrico

**LA:** Ácido Lactobiónico

**MG63:** Línea Celular de Osteosarcoma Humano

**MPM:** Peso molecular medio

**MSC:** Células Madre Mesenquimales

**NaOH:** Hidróxido de Sodio

**PBS:** Solución Buffer Fosfato

**Pc:** pozo control

**p-nitrofenol:** para-nitrofenol

**QT:** Quitosano

**QT: HAP:** Quitosano/Hidroxiapatita

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**rpm:** Revoluciones por minuto

**SEM:** Microscopia Electrónica de Barrido

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**S/cel.:** sin células

**TEM:** Microscopia Electrónica de Transmisión

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilo

**UV:** Luz ultravioleta

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Hueso

### 1.1.1. Estructura y función

El principal componente del tejido óseo son los huesos. El hueso es un complejo tejido dinámico y vascularizado que tiene diferentes funciones, como son la de proteger órganos vitales, brindarle movilidad y soporte al cuerpo; este se encuentra sujeto a continua remodelación y renovación; además sirve como un lugar de unión para músculos y tendones, protege y apoya órganos internos y actúa como un depósito mineral (Czekanska y col., 2012; Kon y col., 2012).

El tejido óseo está estructurado por laminillas de matriz osteoide calcificada, y la disposición de las mismas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. El primero se encuentra compuesto por conductos de Havers, revestido de laminillas concéntricas, en donde se encuentran los osteocitos; mientras que el segundo lo forman laminillas óseas en forma de red que demarcan cavidades alveolares, en cuyo interior se encuentra la médula ósea (Fernández y col., 2006 a)

Los componentes minerales del hueso representan aproximadamente 65 % de su peso, debido a que contiene cantidades considerables de minerales y proteínas. La hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  es una de las formas más estables del fosfato de calcio que se encuentra en los huesos como el componente principal inorgánico (60 a 65 %), con otros materiales orgánicos incluyendo el colágeno, queratina, sulfato de condroitina y lípidos (Fernández y col., 2006 a; Venkatesan y col., 2010).

Los huesos se pueden clasificar en huesos largos, cortos, planos e irregulares, y su interacción es lo que se conoce como sistema esquelético. El tejido óseo maxilofacial que se encuentra compuesto de varios tejidos relacionados con la cavidad oral, incluyendo el hueso y cartílago, mucosa oral, dentina, pulpa dental y glándulas salivares (Kaigler y col., 2001).

### 1.1.2. Formación y remodelación

La regeneración ósea ocurre por medio de un proceso de homeostasis del metabolismo fosfocálcico, y a través del mismo, aproximadamente un 5 % de hueso cortical y 20 % del hueso esponjoso se renueva por año (Parfitt, 1982). El remodelado óseo se puede dividir en varias fases las cuales son: fase quiescente, de activación, de resorción, de formación y de mineralización. En la fase quiescente el hueso se encuentra en reposo. En la fase de activación, se produce la activación de la superficie del hueso antes de la resorción, por medio de la retracción de las células de revestimiento del hueso y la digestión de la membrana por acción de la colágenasa endosítica. La fase de resorción, ocurre cuando los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y descomponer la matriz osteoide, completando dicho proceso por la acción de los macrófagos y permitiendo así la liberación de factores de crecimiento. En la fase de formación en la zonas reabsorbidas se produce la agrupación de preosteoblastos, los cuales fueron atraídos por los factores de crecimiento, y unos días más tarde, los osteoblastos maduros van a sintetizar el material osteoide, el cual va a llenar las área perforadas, y finalmente la fase de mineralización comienza después de treinta días de la deposición de este (Lind y col., 1995; Fernández y col., 2006 b).

Los mecanismos de formación de hueso son la osificación intramembranosa y la endocondral. La osificación intramembranosa se produce en el tejido conectivo, esta es la forma en que se producen los huesos planos de la bóveda del cráneo; en donde células mesenquimales se dividen formándose el blastema óseo, y es a partir de estas que se van a formar los osteoblastos, para posteriormente transformarse en osteocitos. La osificación endocondral es la formación de hueso a partir de formas cartilaginosas en donde la osificación se produce desde el centro hasta los márgenes. El mecanismo por el cual se produce la formación de hueso de manera más común es por osificación intramembranosa (Armstrong y col., 2002)

### 1.1.3. Tipos de células

En el hueso existen varios tipos de células, entre ellas las óseas. Las células óseas se hallan dentro del estroma conjuntivo de la médula ósea, el cual es rico en células mesenquimales indiferenciadas (mesenchymal stem cells) (Fernández y col., 2006 a).

Otras células que se encuentran en el hueso son los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos son células grandes (20 - 30  $\mu\text{m}$ ), de forma poliédrica; procedente de las células mesenquimales multipotentes de la médula ósea. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica a un ritmo de 2 a 3  $\mu\text{m}$  por día y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP). Actualmente se sabe que: sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso; dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extra-celular; contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide: mediante la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de citocinas específicas y sintetizan factores de crecimiento. Una vez que se mineraliza la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro de la misma, transformándose en osteocitos. Estas son las células más abundantes del hueso, poseen forma estrellada, son el estadio final de la línea osteoblástica, y por lo tanto incapaces de renovarse. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero su función principal es la de controlar el remodelado óseo, en el cual también participan los osteoclastos.

Los osteoclastos son células grandes (100  $\mu\text{m}$ ), multinucleadas ricas en mitocondrias y vacuolas, contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), la cual permite la desfosforilación de las proteínas. Estos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas "Unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos", a su vez precursoras de macrófagos y monocitos. Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en forma de cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. (Fernández y col., 2006 a).

## 1.2. Patologías óseas

Existen numerosas afecciones asociadas al tejido óseo, y al tejido óseo maxilofacial, bien sean metabólicas, congénitas o inflamatorias. Todas estas se pueden clasificar de una forma general:

- a) Deformaciones. Estas no son comunes, ya que son congénitas, y por lo general incluyen la pérdida de hueso o la formación de huesos adicionales. Como la acondroplasia
- b) Fracturas. Esta es una de las afecciones ósea más comunes, y pueden ocurrir en todos los huesos, bien sea en los huesos largos, o en el tejido óseo maxilofacial.

Existen otras enfermedades óseas que también son comunes tales como: Osteogénesis Imperfecta, una enfermedad congénita, siendo su principal característica la debilidad de los huesos. Osteoporosis, una enfermedad degenerativa, caracterizada por una disminución en la resistencia de los huesos que es causada por una alteración en el remodelado óseo (Alcocer, 2009). Osteopetrosis, alteración ósea hereditaria, caracterizada por el aumento generalizado y simétrico de la densidad del hueso debido a un trastorno de la actividad de los osteoclastos. Síndrome de Crouzon, caracterizada por la presencia de una deformidad craneal variable, una hipoplasia maxilar y una alteración orbitaria (Raspell, 1997).

Sin embargo, la necesidad de reparación del tejido óseo, no se debe solo a la presencia de afecciones congénitas y otras patologías. Los traumatismos o fracturas, como ya se mencionó, representan quizás la primera causa de daño o pérdida de masa ósea. Las lesiones debidas a accidentes, pueden variar desde fracturas simples hasta fracturas complejas (Wishart, 1974). El uso de componentes de osteo-síntesis (componentes metálicos), son capaces de restablecer temporalmente la funcionalidad, pero son propensos a fallar en el tiempo, requiriendo de cirugías posteriores. Este problema, aunado la incomodidad del paciente, y las limitaciones en la estética, hacen necesaria la búsqueda de terapias regenerativas alternativas; es aquí donde juega un papel preponderante la ingeniería de tejidos.

### **1.3. Terapias actuales para el tratamiento de lesiones óseas**

Las metodologías principales en la regeneración de tejido óseo, se basan en la sustitución del tejido y reconstrucción para aliviar el dolor y así restablecer la estabilidad mecánica y su función. Las estrategias actualmente usadas para el tratamiento de los tejidos perdidos incluyen los autoinjertos, aloinjertos y materiales sintéticos, tendiendo cada una de estas alternativas clínicas una serie de desventajas (Kaigler y col., 2001)

Tradicionalmente los defectos óseos se han tratado implantando tejidos ya sean autólogos, alogénicos, xenogénicos o implantando materiales sustitutos. Los autoinjertos involucran la toma de un fragmento de hueso de una zona sana del paciente y posterior trasplante en la zona afectada, teniendo como características beneficiosas sus propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas. Estos son osteoconductoros porque proveen una matriz en la cual las células pueden proliferar, osteoinductivos debido a que estimulan la proliferación de células indiferenciadas y su diferenciación a osteoblastos, y osteogénicos debido a que son un depósito de células que tienen la capacidad de formar hueso nuevo; además de estas ventajas por ser del mismo paciente este es histocompatible y no produce una respuesta inmunológica, lo que suprime la probabilidad de inmunorreacciones y transmisión de infecciones (Estrada y col., 2006). La principal desventaja de los autoinjertos es la necesidad de un segundo sitio quirúrgico siendo este de donde se toma el fragmento de uso, debido a que la cantidad tomada se encuentra limitada, además de la morbilidad resultante en el sitio de la extracción (Sándor y col., 2003).

Otra alternativa son los aloinjertos que implican la toma y procesamiento del hueso de un cadáver o de un individuo vivo de la misma especie y, posteriormente, su trasplante al paciente. En cuanto a sus propiedades biológicas, estas pueden variar, pero en general poseen una osteoconductividad y osteoinductividad reducida. Una ventaja de los aloinjertos sobre los autoinjertos se encuentra en que existe una mayor disponibilidad, la ausencia de morbilidad en la zona dadora y menor tiempo quirúrgico. Este tipo de injerto tiene como desventaja una menor tasa de incorporación ya que los tiempos para que ocurra dicha incorporación son más prolongados, además del potencial desencadenamiento de una respuesta inmunológica y transmisión de patógenos del donante al hospedero (Estrada y col., 2006; Calvo y col., 2011; Dimitriou y col., 2011).

Afortunadamente, la correcta selección de donante, así como el desarrollo de técnicas de estudio microbiológico, preservación de tejidos y esterilización con distintas dosis de radiación han reducido la transmisión de patógenos y enfermedades. Para la selección de los donantes, es necesario hacer una evaluación clínica de su idoneidad, revisando su historia clínica para descartar causas excluyentes de donación. El objetivo de esto, es detectar enfermedades tumorales pasadas o actuales, infecciosas potencialmente transmisibles, tratamientos o hábitos tóxicos que pudieran comprometer el estado de los tejidos o poner en peligro la salud de los receptores (San Julián y col., 2006)

Los xenoinjertos representan una pequeña proporción en las terapias para el reemplazo óseo, aunque actualmente en desuso, y consiste en la utilización de fragmentos de huesos obtenidos de animales de diferentes especies. En este tipo de terapia se pueden generar un rechazo en el paciente, además de la transmisión de agentes infecciosos, quizás en procesos más agudos que los provocados por los aloinjertos (Estrada y col., 2006).

Los métodos de conservación de los injertos son la crio-conservación y la liofilización. La crio-conservación es el método más comúnmente empleado; la temperatura a la que se conservan los tejidos depende del tiempo requerido de conservación; por ejemplo para conservar algunos días temperaturas entre  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  son suficientes; temperaturas en  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  lo permiten almacenar por un período de 6 meses, y por más tiempo a temperaturas de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y menores logradas con nitrógeno líquido ( $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La preservación por liofilizado va a consistir en la deshidratación por enfriamiento del injerto en vacío; en esas condiciones, el tejido se puede mantener a temperatura ambiente una vez liofilizado; sin embargo, una desventaja de este método es que modifica las propiedades mecánicas. (Calvo y col., 2011)

El procesamiento y disponibilidad de los injertos biológicos, además de las limitaciones antes expuestas, suponen un alto costo y, en muchos casos, largos tiempos de espera. En consecuencia, se han diseñado diferentes técnicas y métodos alternativos para ayudar a reconstruir o reemplazar los huesos fracturados, los cuales pueden ser de diferentes materiales como lo son los implantes sintéticos. Se define a los implantes como elementos que se ubican quirúrgicamente en una región donde el hueso no pudo regenerarse. Son sustitutos artificiales de una fracción del tejido óseo, y

proporcionan ajuste, estética y confort temporal. Existen diferentes tipos de implantes, aunque en su mayoría suelen estar compuestos de aleaciones de titanio y/o cerámicas, los cuales son materiales biocompatibles, favoreciendo su aceptación por el organismo (Falke y Atala, 2000).

Para la elaboración de estos implantes, existen materiales que no tienen origen en seres vivos, tales como metales, plásticos y cerámicos, además de reportarse la fabricación de matrices porosas mediante diferentes técnicas, entre ellas están: gas foaming, solvent casting, rapidprototyping y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foaming, que permiten el procesamiento de los materiales metálicos o cerámicos (hidroxiapatita, fosfato tricálcico) y polímeros de origen natural (colágeno, ácido hialurónico, fibrinógeno, quitosano) o polímeros sintéticos (policarbonatos, polímeros de ácido poliláctico, ácido poliglicólico) (Estrada y col., 2006). Estos materiales van a promover la migración, proliferación y diferenciación de células para la regeneración ósea, además de poder ser utilizados como sustratos no biológicos, ofreciendo así un potencial para el control de la estructura final sin ninguna inmunogenicidad (Dimitriou y col., 2011).

### **1.3.1. Implantes metálicos**

Los primeros materiales metálicos utilizados fueron de acero inoxidable y aleaciones de cobalto-cromo; sin embargo, la fricción que se produce por estos materiales resulta en su fallo, llevando a la búsqueda de otras aleaciones como las de titanio, material que tiene la ventaja de promover la integración del implante al hueso circundante (osteointegración). En cuanto a los materiales de segunda generación se puede decir que consisten en recubrir los materiales ya mencionados con materiales cerámicos y superficies con micro-porosidad a través de microesferas sinterizadas (Navarro, 2008). A pesar de estas propiedades, los implantes metálicos pueden fallar debido a la falta de integración y la fatiga, generando la necesidad de cirugías posteriores.

### **1.3.2. Implantes cerámicos**

Entre los materiales cerámicos de primera generación que más comúnmente son utilizados se tiene la alúmina, zirconia y varias cerámicas porosas, teniendo estos materiales como limitante la micro-estructura que presentan. Estos se utilizan ampliamente en artroplastias totales de caderas. La hidroxiapatita y sus derivados pertenecen a la segunda generación. La aplicación de estos materiales comenzó en la década de los 70, y se han utilizado principalmente como rellenos óseos, ya que debido a las similitudes entre la fase mineral del hueso y su estructura superficial, permiten fácilmente la unión al hueso con o sin la mediación de tejido conectivo (Navarro, 2008). A pesar de estas características, las cerámicas comparten muchas de las limitaciones que poseen los implantes metálicos, además de poseer una alta cristalinidad que las hace propensas a fracturas.

A pesar del hecho de que las técnicas actualmente busquen restaurar la estabilidad y función en un grado razonable, todavía tienen muchas limitaciones. Esto ha conducido a un gran avance de la ingeniería de tejidos, ya sea guiada por la regeneración ósea través del uso de citocinas, por proteínas recombinantes humanas morfogenéticas o por trasplantes de células que ofrecen la posibilidad de formación de estructuras óseas grandes, como lo son las células madre mesenquimales (Kaigler y col., 2001; Infante y col., 2007).

La ingeniería de tejidos, representa una alternativa, en la que se crean implantes con capacidades inductivas y conductivas de regeneración ósea, basándose en biomateriales biodegradables. De esta manera, una vez finalizado el proceso regenerativo, el implante habrá sido reabsorbido, dejando a su paso un tejido óseo con características similares al nativo (Álvarez-Barreto, 2009).

### **1.4. Ingeniería de tejido óseo**

La ingeniería de tejido óseo es un campo interdisciplinario en donde se combinan conocimientos y tecnología de los materiales de ingeniería y los biológicos, teniendo como estrategia la regeneración de los tejidos óseos dañados, ya que combina la células progenitoras (células madre mesenquimales) sembradas en andamios biocompatibles e idealmente tridimensionales como las

estructuras del tejido, utilizando factores de crecimiento adecuados, para así propiciar la regeneración del tejido dañado. Otros métodos de regeneración ósea incluyen terapias basadas en citocinas, siendo esta ventajosa en términos de seguridad, viabilidad y potencial de práctica clínica, pero que resultan en costos muy elevados (Lui y col., 2010; Dimitriou y col., 2011).

En el paradigma de la ingeniería de tejidos sobresalen tres elementos fundamentales: las matrices tridimensionales, las moléculas de señalización y un componente celular, en un ambiente físico-químico apropiado que permita la regeneración del tejido u órgano. Uno de los principales retos de la ingeniería de tejido óseo, es diseñar matrices tridimensionales capaces de imitar las propiedades naturales del hueso (Hutmacher, 2000).

### **1.5. Células madre mesenquimales (MSC).**

Las células madre han sido ampliamente utilizadas para el desarrollo de la ingeniería de tejido óseo. Se define como célula madre a aquella célula que tiene la capacidad de dividirse por períodos indefinidos durante toda la vida de un individuo, que bajo las condiciones apropiadas y señales correctas del micro-ambiente pueden diferenciarse a diferentes linajes celulares con características y funciones especializadas (Donovan, 2001). Debido a la necesidad de autoperpetuación de las células madre, estas necesitan ser capaces de mantener los telómeros con una longitud adecuada para que no se produzcan daños en el ADN (Watt y col., 2000).

Existen varias formas de clasificar a las células madre, de acuerdo al tejido que originan: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las células totipotentes, las cuales son capaces de producir todos los tipos celulares que darán origen a un individuo completo, también al linaje germinal y a los tejidos que darán lugar a las membranas extraembrionarias; estas solo se pueden obtener durante los primeros días después de la fertilización. Las células pluripotentes se encuentran en el blastocito, las cuales pueden dar origen a células diferenciadas a cualquier linaje celular de las tres capas embrionarias (mesodermo, endodermo y ectodermo), así como el saco vitelino. Las células multipotentes se encuentran generalmente en los tejidos adultos; estas poseen una capacidad limitada de diferenciación, ya que dan origen a distintos tipos celulares procedentes

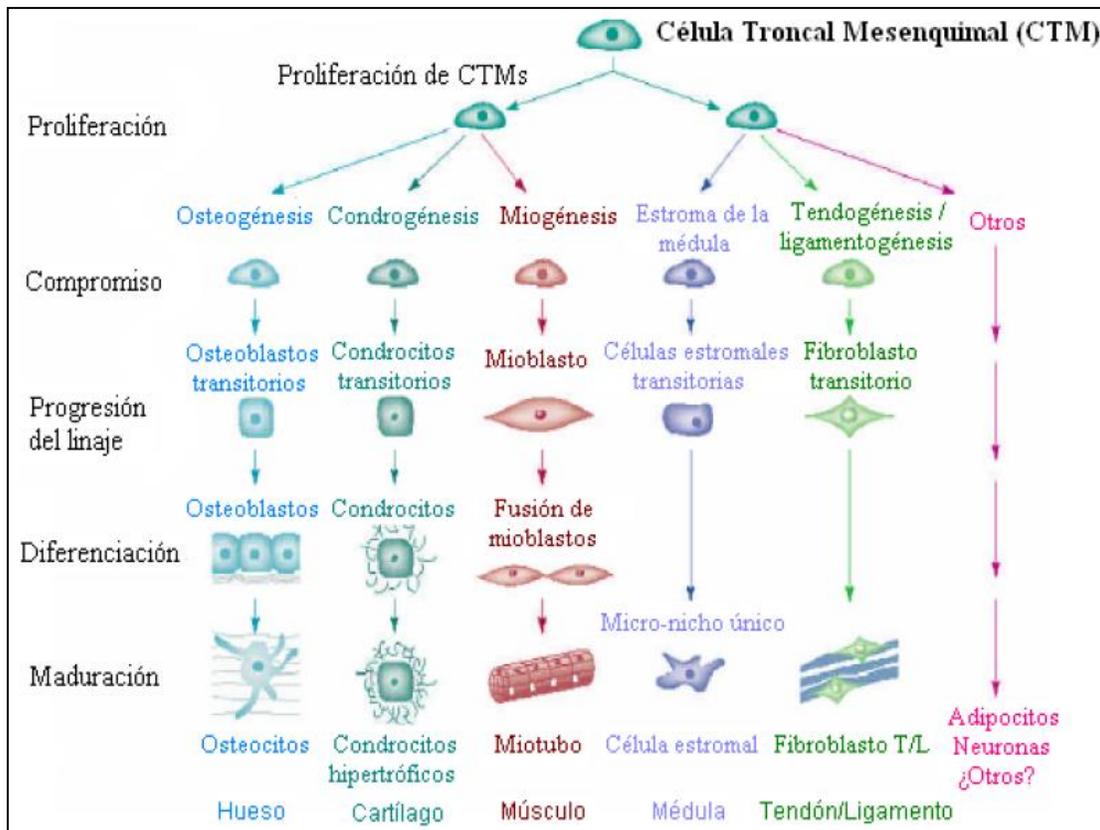
de la misma capa embrafrionario de la cual se derivó el tejido en que se encuentran. Y las células unipotentes, pueden dar origen únicamente a un tipo de célula particular (Weissman y col., 2001; Winslow, 2001; Raff, 2003).

Otra clasificación de las células madre es de acuerdo al tejido de donde se pueden obtener, si proceden del embrión son llamadas células madre embrionarias, obteniéndose partir de las primeras etapas de formación del embrión cuando el óvulo fecundado es una esfera compacta o mórula (Verfaillie y col., 2002), siendo precursores totipotenciales con capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro*. El otro tipo de células madre pueden provenir de un organismo adulto, denominadas células madre adultas, capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de las mismas de capas embrionarias que dieron su origen; en diferentes estudios realizados se ha podido comprobar la multipotencialidad de células madre adultas procedentes de la médula ósea o de sistema nervioso central (Herzog y col., 2003). Esta característica se denomina fenómeno de plasticidad y se fundamenta en la capacidad que tienen las células de alterar su fenotipo en respuesta a los cambios del entorno celular donde se encuentran (Wagers, 2004).

Existe un grupo de células multipotentes, sin diferenciar, conocidas como células madre mesenquimales (Mesenchymal stem cells) las cuales pueden dirigirse hacia líneas celulares muy distintas (Lanza, 2000). Desde 1976 se conoce que estas células pueden dar origen a distintos linajes celulares como: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, entre otros, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes (Fernández y col., 2006).

Las células madre mesenquimales (MSC) son una fuente de células auto-renovables con una alta capacidad proliferativa, y una gran capacidad de diferenciación; se ha comprobado que la médula ósea es la fuente más abundante de MSC (Garcia y col., 2008). Sin embargo, también pueden ser aisladas del hueso trabecular, tejido adiposo muscular, membrana sinovial, en ligamento periodontal y dientes molares permanentes, entre otras. Estas células también han sido encontradas en el cordón umbilical humano, y se ha demostrado que son capaces de sobrellevar una diferenciación osteogénica que conduce a la formación del hueso *in vivo*, e *in vitro*; adicionalmente

pueden diferenciarse hacia los linajes adipogénico y condrogénico como se muestra en la figura 1(Kolf, 2007; Steinhoff, 2011).



**Figura 1.** Diferenciación de células madre mesenquimales en múltiples linajes mesodérmicos. Tomado y modificado de: Caplan y Bruder, 2001.

La morfología de las MSC son de tipo fusiformes, como fibroblastos, difíciles de distinguir de las otras células obtenidas del aspirado medular (Kolf, 2007). Para identificar las MSC *in vitro*, los investigadores se basan en dos características principales de estas células, en su capacidad de adherirse al plástico de cultivo, y en que son positivas para un número específico de marcadores de superficie, tales como CD29, CD44 y CD271 y negativos para los marcadores hematopoyéticos (generalmente, CD34 y CD45) (Rodríguez, 2005; Kuci, 2010).

Las MSC, en el organismo adulto, representan reservorios de células reparadoras sin ninguna característica específica para ningún tejido. Las señales que disparan el proceso podrían ser la propia lesión, la inflamación o la necrosis (Tuan, 2003).

Existen diferentes modelos de osteodiferenciación de las células madre, en donde se define a dicho proceso completo en una serie de etapas, las cuales describen la maduración progresiva de la célula desde que son células madre mesenquimales indiferenciadas hasta transformarse en osteoblastos. En la diferenciación *in vitro* de las MSC, se pueden observar cambios tanto a nivel celular como molecular, obteniendo al cabo de 14 días aproximadamente una matriz extra-celular mineralizada, que es considerado el marcador fenotípico terminal de la vía de diferenciación osteogénica (Jaiswal, 1997). La diferenciación de las células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea se caracteriza por un aumento de la expresión de la enzima fosfatasa alcalina y la formación de depósitos de calcio, luego de ser expuestas a dexametasona,  $\beta$ -Glicerolfosfato ( $\beta$ -GP) y ácido ascórbico en presencia de suero fetal bovino al 10 % (Pittenger, 1999).

La dexametasona es un adenocorticoide sintético que posee propiedades antiinflamatorias, inmunosupresoras y reguladoras del calcio sanguíneo, la cual es capaz de fluir pasivamente a través de la membrana celular debido a su alta liposolubilidad, para ligarse a su receptor específico en el citoplasma dando origen a un complejo esteroide – receptor, capaz de entrar en el núcleo donde ha de regular la expresión de los genes, modulando la transcripción y modificación de la función celular hasta inducir la diferenciación hacia un fenotipo específico, aumentando así la actividad de la fosfatasa alcalina y acumulación mineral en las células produciendo la diferenciación osteoblástica de las mismas (Fuentes, 2008; Flores, 2010; Meyer, 2012).  $\beta$ -GP, el cual es un fosfato orgánico, tiene la capacidad de proveer los grupos fosfatos y estimular la calcificación de la matriz extracelular secretadas por las células madre *in vitro*. Siendo este un sustrato para la fosfatasa alcalina, en cuya reacción enzimática se produce un incremento de los fosfatos inorgánicos en el medio (Hamade y col., 2003). El ácido ascórbico (vitamina C) puede actuar como antioxidante, agente donador de electrones, cofactor para el óptimo crecimiento de enzimas así como sustrato enzimático (Mathews y col., 2003). En estudios *in vitro* estimula la hidroxilación de aminoácidos y procesamiento del procolágeno a colágeno. Debido a que la síntesis de colágeno depende de la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en el retículo endoplásmico de las células, en donde se va a formar hidroxiprolina e hidroxilisina; y las enzimas hidrolasas, que catalizan esta reacción, estas requieren del ácido ascórbico para funcionar correctamente (Fuentes, 2008; Flores, 2010)

De esta manera, las MSC que tienen una apariencia fibroblástica, cambiarán su morfología a forma cuboidal y comenzarán a crecer en colonias. Existen tres etapas marcadas en el proceso de la diferenciación osteoblástica de las MSC *in vitro*, la primera en donde la principal función celular es la expansión mitótica y la producción de colágeno tipo I, llamada etapa de proliferación. En la segunda etapa, o etapa de diferenciación temprana, tanto la proliferación como la producción de colágeno disminuyen y se sobre regula la expresión de la enzima fosfatasa alcalina; y en la tercera etapa (etapa de maduración) disminuye la actividad de fosfatasa alcalina y se observa el depósito de cristales de calcio entre las fibras de colágeno de la matriz extra-celular secretada (Álvarez-Barreto, 2010). Las células madre mesenquimales (MSC) presentan un alto potencial de diferenciación osteogénica y por lo tanto tienen un gran potencial en terapias regenerativas. Sin embargo, por ser anclaje-dependientes, estas necesitan de un biomaterial para su implantación, en el que puedan adherirse, proliferar y llevar a cabo el proceso de diferenciación.

## **1.6. Biomateriales**

La investigación sistemática sobre los materiales tolerables por el organismo para la fabricación de prótesis e implantes se impulsó después de la segunda Guerra Mundial. Durante los años 60 se publicaron los primeros estudios sobre las lesiones provocadas por la presencia de un implante, siendo en este momento que se menciona la biocompatibilidad, que define el grado de tolerancia del biomaterial por parte del organismo (Lizarbe, 2007). Se define a los biomateriales, desde el punto de vista de la reparación y regeneración de tejidos humanos, como aquellos productos que son empleados para suplir o reforzar la función de los tejidos vivos, de una forma segura y aceptable fisiológicamente, pudiendo ser temporales o permanentes (Williams, 1999). Una característica fundamental de los biomateriales es que al encontrarse en contacto con los tejidos vivos no debe producir ningún tipo de alteraciones; los biomateriales deben ser biocompatibles, es decir ser aceptados por el paciente y no provocar rechazos (Lizarbe, 2007).

La biocompatibilidad de un material es determinada realizando diferentes tipos de ensayos que orienten sobre su comportamiento en entornos que simulan al fisiológico (Marques, 2002); para ello se realizan técnicas básicas como los cultivos celulares, que permiten determinar la respuesta

de las células a la presencia de diferentes materiales, mediante la evaluación de cómo se produce la adhesión celular, extensión, crecimiento en presencia del material, o determinando las actividades enzimáticas y metabólicas que pueden alterarse por la presencia del material objeto de estudio (Pearce, 2007). Los requisitos básicos de un biomaterial para ser utilizado en la regeneración del tejido dañado son: que sea biocompatible, no puede ser tóxico, ni carcinógeno, ser biodegradable durante el tiempo programado, adecuada resistencia mecánica en el entorno, permitiendo así la durabilidad y eficacia del material. Además se debe tomar en cuenta el tamaño y la forma de la lesión que determinará la elección del material, sin olvidar que su fabricación sea reproducible (Lizarbe, 2007).

Entre los productos utilizados como biomateriales se encuentran cerámicas, vidrios, acero y otras aleaciones metálicas, polímeros sintéticos de múltiples clases, polímeros naturales, tejidos biológicos modificados, etc. (Hench, 1982).

Sin embargo, al ver la evolución de los biomateriales en la investigación, se pueden distinguir tres generaciones las cuales son materiales bioinertes (primera generación), materiales bioactivos y biodegradables (segunda generación) y materiales diseñados para estimular respuestas celulares específicas (tercera generación); aunque los materiales de cada una de estas generaciones se utilizan con éxito actualmente, y los materiales de la tercera generación abre nuevas posibilidades de tratamientos, pero no la sustitución de los materiales ya existentes (Navarro, 2008)

### **1.6.1. Polímeros**

Los polímeros son los principales biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos, y otras aplicaciones biomédicas como la liberación controlada de fármacos. Una de las ventajas es que se les puede otorgar una variedad de propiedades por la integración de grupos químicos funcionales, o macromoléculas. La forma, estructura, textura, rigidez y flexibilidad son propiedades que determinan su utilización (Lizarbe, 2007).

Existen dos grandes grupos de polímeros, los elastómeros y los plásticos. Los elastómeros pueden ser sometidos a grandes deformaciones, y tienen la capacidad de readquirir sus dimensiones y formas originales. Los plásticos, son materiales cuya estructura es más rígida y pueden subdividirse en función de su comportamiento térmico (Hoffman, 2002).

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales de cadenas poliméricas entrecruzadas, que debido a su naturaleza hidrofílica pueden absorber grandes cantidades de agua. Su estructura puede ser diseñada de acuerdo a su aplicación mediante la selección de los materiales de partida, así como los procesamientos y técnicas que van a ser empleadas (Ottenbrite y col., 2010).

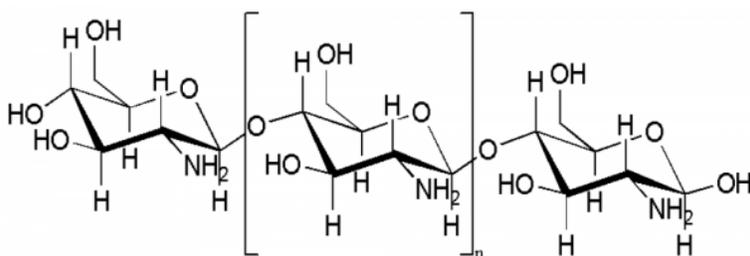
Los hidrogeles tanto elastómeros como plásticos pueden incorporar a la matriz hidratada diversas moléculas de otros materiales. En la mayoría de los hidrogeles se han utilizado polímeros naturales ya sean polímeros aniónicos (ácido hialurónico, condroitín sulfato y ácido algínico), polímeros catiónicos (polilisina y quitosano), polímeros anfipáticos (colágeno, fibrina) o polímeros neutros (dextrano), así como una gran número de polímeros sintéticos o mezclas de los mismos como PGA (ácido poliglicólico) y PLA (Poliláctido) (Hahn y col., 2004).

Frecuentemente para la preparación de hidrogeles se utiliza polimerización por radicales libres, utilizando una reacción redox o foto-polimerización con luz ultravioleta (UV), teniendo como ventaja la foto-polimerización que su tasa de entrecruzamiento es rápida; una desventaja de esta técnica es la intensidad de la luz UV y el calor producido, ya que esto puede tener efectos negativos en la actividad metabólica celular y llegar a provocar necrosis. Es por ello, que la intensidad de la luz UV es limitada, aproximadamente de 5-10 mW/cm<sup>2</sup>, con el fin de prevenir el daño celular (Ottenbrite y col., 2010).



### 1.6.2. Quitosano (QT).

La quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, siendo el quitosano producido a partir de la quitina por una serie de procesos. El quitosano (QT) es un polisacárido natural que se encuentra en cangrejos, corales y hongos, producido principalmente a partir de crustáceos marinos, el cual consiste de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-D-glucosa y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-D-glucosa las cuales se encuentran unidas (figura 3) (Venkatesan y col., 2010).



**Figura 3.** Estructura del quitosano. Tomado de Venkatesam y colaboradores., 2010.

Existen varios métodos para extraer el QT, resaltando el método enzimático, una gran alternativa que se ha desarrollado recientemente (Venkatesan y col., 2010). Para la obtención del QT a partir de la quitina se requiere de un tratamiento con el fin de remover los pigmentos, las sales tales como el carbonato de calcio y las proteínas que se encuentran asociadas (Parada y col., 2004). En donde el grado de desacetilación y el peso molecular depende de la fuente y el método de preparación (rangos de peso molecular van desde 300 hasta 1000 KDa y el grado de desacetilación desde 30 hasta 95 %) (Venkatesan y col., 2010).

En las últimas dos décadas, el QT se ha venido desarrollando considerablemente en las aplicaciones biomédicas debido a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, la porosidad de la estructura que puede adquirir por medio de procesos mecánicos, la idoneidad para el crecimiento celular, osteoconducción y su naturaleza antibacteriana intrínseca. Este ofrece un rango amplio de aplicaciones que incluyen ingeniería de tejidos del cartílago, cicatrización de heridas, y aplicaciones ortopédicas. Este puede ser modificado en varias formas como son: películas, fibras, bandas, esponjas y más complejas formas para los tratamientos ortopédicos, y puede ser combinado con

una variedad de materiales tales como la hidroxiapatita, aligonato, ácido hialurónico, fosfato de calcio y factores de crecimiento con potencial en aplicaciones ortopédicas (Venkatesan y col., 2010).

El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de QT es lo que se denomina grado de desacetilación, y se encuentra estrechamente vinculado con su solubilidad, ya que este es insoluble normalmente en soluciones acuosas por encima de pH 7. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, se aumenta la capacidad hidrofílica del QT, y este pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (acético, fórmico, clorhídrico, entre otros), debido a que el pKa del grupo amino del quitosano es de 6,5. La protonación de los grupos amino del QT en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo (Acosta y col., 1993).

El QT es un agente viscosizante en medio ácido, el cual se comporta como un material pseudo-plástico, cuya viscosidad aumentará al incrementar su concentración, y si se incrementa la temperatura y el grado de desacetilación, la viscosidad disminuirá (Sinha, 2004). Cuando se encuentra en una forma de bajo grado de desacetilación, llega a ser soluble hasta pH de 9, mientras que con un grado de desacetilación alto es soluble hasta pH de 6,5. Al agregar sales a la solución de quitosano, se ha observado que disminuye la solubilidad, ya que aumenta la fuerza iónica del medio (Errington y col., 1993). Este efecto se produce debido a que el quitosano en solución, tiene una conformación extendida al repelerse las cargas positivas desacetiladas de cada unidad.

Los hidrogeles basados en QT se desarrollaron a partir de soluciones acidificadas del mismo, seguido de un proceso de neutralización. También se han desarrollado modificaciones químicas de quitosano con diferentes restos hidrofílicos a fin de hacerlo soluble en agua, a pH fisiológico, demostrando en estudios que dichos hidrogeles pueden utilizarse en procesos de inducción de la condrogénesis y osteogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (Ottenbrite y col., 2010).

### **1.6.3. Hidroxiapatita (HAP)**

La hidroxiapatita (HAP) es el componente principal de los tejidos calcificados (huesos y dientes). Su forma sintética es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , la cual ha sido ampliamente utilizada como un implante del material óseo, debido a sus excelentes propiedades osteoconductoras. La HAP ha sido

utilizada en una gran variedad de aplicaciones biomédicas como en matrices para la liberación controlada de fármacos, cementos óseos, aditivos de dentífricos, implantes dentales etc. (Venugopal y col., 2010).

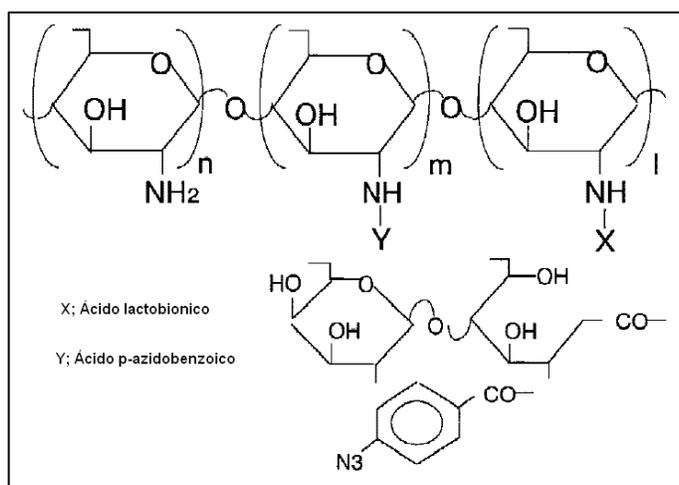
La HAP es considerada como una plantilla estructural para la fase mineral del hueso; dado que es el mayor componente inorgánico del mismo, es utilizado comúnmente como biomaterial en sustituciones óseas debido a su alta bioactividad y biocompatibilidad (Venugopal y col., 2010). Su carácter iónico la hace una cerámica dura, refractaria, con un punto de fusión mayor que 1500 °C, además de la capacidad de sustitución parcial o completa iones de la red por otros de tamaño similar ( $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  por  $\text{K}^+$  o  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{OH}^-$  por  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ) (Londoño y col., 2006).

En los últimos años la HAP ha sido sometida a numerosas investigaciones, ya que se plantea su uso como material cerámico de fosfato de calcio, el cual es totalmente compatible y poco tóxico, que puede presentarse como un compuesto policristalino, denso o poroso que se convierte en parte integral del tejido vivo. La biocompatibilidad de la hidroxiapatita sintética ha sido sugerida no solamente por su composición, sino por los resultados obtenidos en su implantación *in vivo*, los cuales han demostrado la ausencia de toxicidad local o sistémica. Se ha demostrado la aposición directa de hueso nuevo a este material, sin la intervención de tejido fibroso, es por ello que ha sido ampliamente aceptado en cirugía maxilofacial, para rellenar fallas óseas, crestas por quistes o tumores, traumas enfermedades congénitas y otras intervenciones quirúrgicas (Quintana, 1998; Kong, 2010).

## 2. ANTECEDENTES

Los materiales que se han propuesto para este estudio son el quitosano y la hidroxiapatita; ambos ya han sido estudiados en diferentes trabajos que se encuentran en la literatura, aunque en la mayoría de esos estudios se han empleado por separados, o incorporando la unión de otros materiales, y entrecruzamiento de ambos materiales con agentes entrecruzantes tóxicos.

Una modificación importante del quitosano es la propuesta en 1999 por Ono y colaboradores, en donde se introducen restos de lactosa y azida, para hacerlo soluble a pH fisiológico y foto-entrecruzable, realizando un hidrogel biocompatible para los tejidos blandos. Se demostró que el hidrogel de quitosano posee una actividad citotóxica mínima, la cual fue evaluada con fibroblastos de la piel, las células endoteliales humanas, y células humanas de la musculatura lisa. Esta referencia es importante ya que es a partir de esta, que se hace la modificación de quitosano en el presente trabajo.



**Figura 4.** Estructura química foto-entrecruzable de AZ-QT-LA. Tomado y modificado: de Ono y col., 1999.

Entre los estudios que tienen mezclas de QT e HAP se encuentra el realizado por Yubao y colaboradores en el 2005, donde por medio de distintas técnicas, se caracterizaron estos materiales, además de realizar pruebas *in vitro* para investigar la biodegradabilidad y bioactividad del hidrogel. Otro trabajo realizado por Teng y colaboradores en el 2007, en donde por medio FTRI se mostró que el QT y la HAP tienen una buena miscibilidad, también por medio de la microscopía electrónica de

barrido se reveló que las partículas de hidroxiapatita se distribuyeron uniformemente en la matriz de QT. En cuanto al cultivo celular, se observó una sobre regulación de la enzima fosfatasa alcalina con una concentración máxima de hidroxiapatita de 30 %.

En el 2009, Liuyun y colaboradores estudiaron las propiedades de los andamios compuestos por nano-hidroxiapatita/quitosano/carboximetil celulosa para ingeniería de tejido óseo, en donde probaron las propiedades físico-químicas de este por espectroscopia de infrarrojo (FTIR), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Además evaluaron sus propiedades biológicas utilizando células madre mesenquimales (MSC) y MG63 (Osteosarcoma Humano), tanto en cultivo *in vitro* como en un corto periodo *in vivo*. Se obtuvo que el material presentó buenas propiedades físico-químicas, puesto que interactúan a través de cargas iónicas y la hidroxiapatita queda embebida dentro de la matriz de manera uniforme. En cuanto a las propiedades biológicas encontraron que no es un andamio tóxico, tiene buena biocompatibilidad celular, y con las pruebas *in vivo* que tiene buena biocompatibilidad tisular.

García y colaboradores en el 2010, mostraron un trabajo en donde se tiene un hidrogel formado por QT, gelatina y dextrano; en este estudio por medio de FTIR y calorimetría diferencial de barrido confirmaron la presencia de una red híbrida de polímeros, debido a las reacciones de entrecruzamiento entre las cadenas de los polímeros, gelatina-QT.

Peniche y colaboradores en el 2010 muestran un resumen de las principales formulaciones entre el QT y un material cerámico (hidroxiapatita y cemento de fosfato de calcio) en donde a través de estas mezclas se obtienen membranas, películas, andamios y material inyectable como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Métodos de obtención de quitosano/hidroxiapatita, y sus formulaciones. Tomado y modificado de: Peniche y col., 2010.

Métodos	Formulaciones
<b>Mezcla de ambos componentes, quitosano-hidroxiapatita</b>	Membranas, películas y andamios
<b>Incorporación de quitosano con cementos de fosfatos de calcio (CPCs)</b>	Soportes macro-porosos y material inyectable
<b>Revestimiento de hidroxiapatita con quitosano</b>	Películas multicapas, placas, andamios porosos y otros
<b>Preparación <i>in situ</i> y co-precipitación del componente inorgánico bioactivo dentro de la matriz polimérica</b>	Películas, partículas, soportes porosos y otros

En general, el método consiste mezclar la hidroxiapatita con una solución previamente preparada de QT para generar una suspensión lo más homogénea posible, los andamios que son generados a partir de esta mezcla poseen estructuras porosas como esponjosas por medio de congelación y liofilización, o mezclando una pasta compuesta por aluminio, hidroxiapatita y quitosano en diferentes proporciones.

Por otra parte Hernández y colaboradores en el 2011, se plantearon el cultivo de MSC provenientes de tejido conjuntivo gingival sobre una matriz de QT, pudiendo obtener a partir de dicho tejido un cultivo de MSC que cumplieron con los criterios tanto morfológicos como fenotípicos, pero a pesar de tener una proliferación celular encontraron que la utilidad del quitosano como andamio y medio de transporte de MSC es deficiente, ya que se ven alteradas sus propiedades químicas, disolviéndose, y que este requiere de la combinación con otro material.

Mi Zo y colaboradores en el 2012, en donde realizaron andamios de QT: HAP utilizando la técnica de liofilización, en donde por microscopia electrónica de transmisión y por FTIR se

caracterizaron dichos andamios, y en estudios *in vitro* utilizando osteoblastos humanos obtuvieron una mayor proliferación celular y viabilidad por mayor tiempo, demostrando que este sistema es ideal para ser utilizado en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

- Evaluar el potencial osteogénico de un sistema inyectable de quitosano fotosensible con hidroxiapatita, utilizando cultivos de células madre mesenquimales, para la regeneración del tejido óseo maxilofacial.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Modificar el quitosano con la lactosa y azida a fin de hacerlo soluble a pH fisiológico y fotosensible respectivamente.
- Establecer las diferentes composiciones de trabajo del sistema inyectable en cuanto al contenido de quitosano e hidroxiapatita.
- Cultivar células madre mesenquimales sobre el sistema quitosano-hidroxiapatita.
- Evaluar la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales cultivadas sobre el sistema establecido.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Elaboración de los hidrogeles de quitosano**

#### **4.1.1. Solubilización del quitosano (QT)**

Se preparó una solución de quitosano de peso molecular medio ( $4,3 \times 10^5$  g/mol y un grado de desacetilación del 80 %, Sigma) al 1,5 % p/v utilizando quitosano en polvo, diluido en HCl al 0,2 M bajo agitación magnética. Y las mismas condiciones para el de peso molecular bajo.

#### **4.1.2. Modificación química con ácido lactobiónico (LA) (QT-LA)**

Para la modificación, se utilizó el protocolo propuesto por Ono y colaboradores (1999). Bajo agitación magnética y baño de maría, se adicionó N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) marca Sigma - Aldrich (50 mM) a la solución anterior, se le ajustó el pH a 5 con la adición de pequeñas alícuotas de HCL y se agregó N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-clohidrato de etilcardimida (EDC, Sigma-Aldrich) (4 mg/ml) y ácido lactobiónico (LA, Sigma - Aldrich) (0,03 mg/ml). La solución obtenida se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 horas.

Para purificar el quitosano y eliminar el LA sin reaccionar, se realizó una diálisis de la solución durante 72 horas, utilizando membranas con un corte de 3500 (en este proceso, las partículas más grandes que el tamaño del poro de las membranas, como el quitosano, quedarán retenidas dentro de la misma). El agua destilada que se utilizó para realizar la diálisis se cambió dos veces al día. Una vez realizada la diálisis, la solución dializada fue congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y liofilizada, para extraer toda el agua de las muestras y tener el quitosano deshidratado, en forma esponjosa.

#### **4.1.3. Modificación química con ácido 4- azidobenzoico (AZ) (AZ-QT-LA)**

El producto liofilizado de LA-QT se disolvió en agua destilada a una concentración del 1 % p/v. Este proceso requirió agitación vigorosa en vortex alternado con calentamientos en baño de maría a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos cada ciclo, hasta que se observó la completa disolución.

A esta solución se adicionó TEMED (50mM) y se procedió a ajustar el pH a 5. Se agregó EDC (3,5 mg/ml) y ácido 4- azidobenzoico (AZ) marca TCI, a una concentración de 2 mg/ml. La reacción se llevó a cabo durante 72 horas bajo agitación magnética protegida de la luz. El sistema resultante se dializó, en ausencia de luz, tal como se explicó anteriormente. Posteriormente se liofilizó en las mismas condiciones.

#### **4.2. Construcción de los Hidrogeles de Quitosano-Hidroxiapatita (QT-HAP)**

Para la construcción de los hidrogeles se utilizó una solución de QT a una concentración final del 2 % p/v. A partir de esta solución, se tomaron alícuotas que fueron mezcladas con cantidades determinadas de hidroxiapatita (HAP, nanopartículas de hidroxiapatita, Sigma- Aldrich) ( $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ ). Estas mezclas fueron colocadas bajo luz UV ( $5000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) por 3 min a fin de inducir el entrecruzamiento de las cadenas de QT modificado, para finalmente obtener un hidrogel en el cual se encuentra atrapada la HAP. En este proceso, los grupos azida ( $\text{N}_3$ ) van a liberar nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), así los grupos nitreno del quitosano van a interactuar rápidamente causando así la gelificación. Para establecer las composiciones de los hidrogeles, se determinó, primeramente, la cantidad máxima de HAP que permitía la gelificación de la solución del quitosano. Para efectos de este estudio, se establecieron cuatro composiciones de HAP, un alta (con la cantidad máxima de HAP previamente determinada), dos intermedias y una baja, utilizando concentraciones de QT al 2 % P/V, resultando en proporciones QT: HAP de 90:10, 70:30, 50:50 y 30:70. Se utilizaron hidrogeles de QT solo (sin HAP) como controles. Para el uso de los hidrogeles en cultivos de las células madre, las mezclas de QT-HAP fueron esterilizadas en el autoclave por un tiempo de 10 min y se dejaron enfriar, para posteriormente colocarlas en placas de 24 pozos en alícuotas de 250  $\mu\text{l}$  por pozo, y se indujo la gelificación bajo luz UV, en las condiciones mencionadas. Los hidrogeles resultantes se mantuvieron hidratados en una solución buffer fosfato salina (PBS) hasta el momento de sembrado de las células.

### **4.3. Aislamiento y cultivo de las células madre mesenquimales de médula ósea de rata (MSC)**

Fémures provenientes de ratas Wistar (machos de aproximadamente 9 semanas) fueron colocados en medio  $\alpha$ -MEM [(bajo en glucosa con L-glutamina, 110 mg/L piruvato de sodio, ribonucleótidos, deoxiribonucleotidos y bicarbonato de sodio, GIBCO, con rojo fenol como indicador de pH), con 20 % de antibiótico y antimicótico Anti-Anti (antibiotic- antimycotic 100X, GIBCO)] durante 30 minutos a 4 °C.

Transcurrido este tiempo, se trabajó en condiciones de asepsia bajo la campana de flujo laminar. Se eliminaron los restos de tejido conectivo con gasa; una vez limpios todos los fémur; para esterilizarlos se colocaron en etanol al 70 % durante 5 min, transcurrido este tiempo se pasaron por agua destilada estéril y se hicieron tres lavados con PBS estéril suplementado con 20 % de anti-anti, durante 10 min. Seguidamente se procedió a cortar la epífisis del hueso en la parte inferior del fémur y por el extremo cerrado del fémur (metáfisis) se perforo y penetro con una jeringa cargada con medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 10 % de SFB (Suero fetal bovino). Luego la médula ósea fue desprendida, descargando el contenido de la jeringa a presión. Esto último se realizó sujetando el hueso sobre la boca de un tubo cónico de 50 ml en el que caerá la médula ósea evitando que caigan restos de hueso en el medio. Luego se homogeneizó el medio con la médula empleando una pipeta, para obtener un pool de células. La suspensión resultante se distribuyó en placas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y se completó hasta 12 ml de medio con  $\alpha$ -MEM suplementado con 10 % SFB. Las placas fueron almacenadas en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de humedad relativa. Transcurridos 4 días del sembrado de las células, se descartó todo el medio y se lavaron las placas con PBS estéril para eliminar los restos de la médula y las células no adherentes, las cuales son la población de células no mesenquimales. A cada placa se le agregó 12 ml de  $\alpha$ -MEM suplementado y el medio fue cambiado cada dos días, hasta que se observó una confluencia de aproximadamente 80 %.

#### 4.4. Cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea de rata

Una vez que las células madre mesenquimales alcanzaron un 80 % de confluencia en las placas T-75, estas fueron desprendidas enzimáticamente del fondo de la placa, utilizando una tripsina comercial estéril (Trypsin 1X Gama Irradiated, 0.25 % Trypsin [1:250+] en HBSS con 0.1% EDTA-2Na con Ca y Mg, SAFC Biosciences™). Para esto, se descartó el medio de cultivo y se lavaron las placas con PBS estéril, debido a que el SFB inactiva a la tripsina.

Luego se agregó a cada placa 2 ml de tripsina y se dejó actuar durante 2 minutos en la incubadora a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se agregó 4 ml de medio  $\alpha$ -MEM suplementado a cada placa, para inactivar la tripsina y lavar la superficie para terminar de desprender las células. Se recolectó todo el volumen de cada placa y se colocó en un tubo cónico de 15 ml.

Una vez concluido este procedimiento, se centrifugaron las células, durante 10 minutos a 500 g a una temperatura de 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el taco celular se resuspendió en  $\alpha$ -MEM, para luego ser sembradas nuevamente en otras placas de igual volumen.

Cada vez que se realizó este procedimiento se definió un pase de proliferación. Para el desarrollo de todos los ensayos de diferenciación, se utilizaron células madre mesenquimales de médula ósea de pase 3, esto con el objetivo de tener un número suficiente de células y garantizar una población más homogénea. Una vez que las células madre mesenquimales del pase 3 se desprendieron de las placas y fueron resuspendidas en medio  $\alpha$ -MEM suplementado, se comprobó la viabilidad celular, por la prueba del azul tripano, (método de tinción histológica que diferencia las células viables de las células muertas, basado en la diferencia de permeabilidad del colorante a través de la membrana celular).

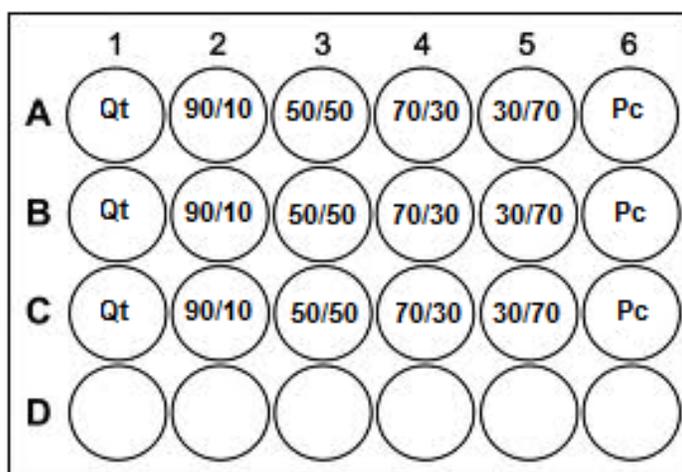
Para realizar el conteo de células se utilizó la cámara de Neubauer, el número de células en suspensión se determinará mediante la siguiente fórmula:

Número de células = [promedios de células contadas por cuadrante central] x  $[10^4]$  x [factor de dilución] x [ml de cultivo], previa dilución 1:1 de células con azul de tripano.

A partir del conteo se realizaron las diluciones necesarias para obtener aproximadamente  $5 \times 10^4$  células sembradas en cada hidrogel.

#### 4.5. Sembrado de las MSC en los hidrogeles de quitosano e hidroxiapatita

Para los cultivos celulares sobre los andamios (hidrogeles), se utilizaron placas de 24 pozos, donde se tenía una placa por cada tiempo definido en días. Cada placa tuvo un hidrogel por pozo, y se colocaron hidrogeles con cada una de las composiciones establecidas para el sembrado celular, además de dejar pozos control (Pc) en donde contenían solo células. Se realizaron otros hidrogeles que sirvieron como blanco para cada una de las concentraciones establecidas (sin sembrado de células), además se colocó un pozo control (Pc) el cual no contenía células ni hidrogel.



**Figura 5.** Esquema de placa de 24 pozos para los ensayos, de los diferentes días de cultivo tanto en las muestras con células como las sin células.

Una vez contadas, las células fueron resuspendidas en medio  $\alpha$ -MEM, y se sembraron las células sobre los hidrogeles a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ . Se permitió la adhesión celular por 24 h, y una vez transcurrido este tiempo se cambió el medio, esta vez utilizando medio osteogénico, el cual consiste en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 10 % SFB,  $10^{-8}$ M dexametasona, 0,05 mM Ácido ascórbico y 10 mM  $\beta$ -GP. La dexametasona es directamente responsable de iniciar el proceso de diferenciación de las células madre hacia osteoblastos, mientras que el ácido ascórbico

induce la secreción de colágeno tipo I, y el  $\beta$ -GP interviene en la formación de las sales de calcio que se depositarán entre las bandas del colágeno secretado. Se llevaron a cabo cultivos en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 10 % de SFB como control negativo de diferenciación osteogénica.

Los cultivos de diferenciación y controles se realizaron durante los tiempos 4, 10, 16 y 21 días de crecimiento de las células en los hidrogeles. Se realizó el cambio de medio de las placas cada dos días hasta la fecha de culminación de cada tiempo de crecimiento de las células.

Para la evaluación de la diferenciación osteogénica de las células se midieron los marcadores: proliferación celular, actividad de la fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés) y la cantidad de calcio que es depositada, y se estudió la morfología celular, en cada uno de los tiempos estipulados.

#### **4.6. Determinación del número de células adheridas a los hidrogeles. Cuantificación del ADN**

Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se descartó el medio y se reemplazó con agua bidestilada estéril. Se sometieron los hidrogeles con las células a 3 ciclos de congelado-descongelado, y desintegraron usando un homogeneizador electrónico a 10000 rpm por 3 min y dos ciclos de congelado-descongelado, esto con la finalidad de lisar las células y liberar su contenido, además se realizó el mismo procedimiento a las placas que no contenían células sembradas, para tener homogeneidad en las condiciones de todos los grupos, y conocer si hay interferencia del hidrogel con cada uno de los ensayos realizados.

El ensayo de cuantificación de ADN se realizó utilizando el fluoróforo Pico Green® (Invitrogen), el cual interactúa selectivamente con el ADN de doble cadena. Adicionalmente se elaboró una curva patrón de ADN utilizando soluciones de concentraciones conocidas de ADN  $\lambda$  (apéndices 10.5.1 y 10.5.2). Se tomaron 40  $\mu$ l de muestras (lisados) o de solución patrón y se distribuyeron en placas negras de 96 pozos. A cada pozo se le agregó 107  $\mu$ l de tampón de reacción (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) y 150  $\mu$ l del colorante Pico Green® diluido en tampón. Luego de 3 min, la fluorescencia fue medida a 490 nm de excitación y 520 nm de emisión en un lector de placas TECAN, Infinite200.

El número de células se calculó utilizando la cantidad total de ADN determinado en la muestra, dividido por la cantidad de ADN contenido en una célula, la cual fue previamente determinada en el laboratorio como 3 pg de ADN por célula, como se muestra en el apéndice 10.6.1; utilizando la curva de calibración que se realizó. Los datos fueron graficados haciendo sustracciones de los grupos que contenían células menos los grupos que no contenían células.

#### **4.7. Determinación de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP)**

Este parámetro se midió mediante el uso de un ensayo espectrofotométrico, el kit empleado fue: "Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) isquel substrate system for ELISA", (Sigma, P7998-100MI) utilizando p-nitrofenol para realizar la curva patrón. Alícuotas de 40 µl de muestras y de soluciones patrón se agregaron en una placa transparente de 96 pozos, junto con 100 µl de la solución sustrato (5 mM para-nitrofenilfosfato, en 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M de 2-amino-2-metil-1-propanol) El para-nitrofenilfosfato reacciona directamente con la ALP, formando ácido fosfórico y para-nitrofenol, el cual puede ser detectado por absorbancia. Después de transcurridos 30 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de 0,1 M NaOH. Se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas TECAN. Se elaboró una curva patrón utilizando soluciones patrón de concentraciones conocidas de para-nitrofenol (apéndice 10.5.3). La actividad de ALP se calculó con la fórmula que se muestra en el apéndice 10.6.2. Los datos de ALP fueron graficados haciendo sustracciones de los grupos que contenían células menos los grupos que no contenían células.

#### **4.8. Determinación de la deposición de calcio en los hidrogeles**

La cantidad de calcio depositada en cada hidrogel se determinó utilizando el método de o-cresolftaleína, empleando un kit Calcium Reagent Set de Pointe Scientific, inc.

Los lisados celulares se mezclaron con un volumen igual de ácido acético 1 N para crear sales de calcio que sean solubles en agua. Se preparó una solución de trabajo que tuvo volúmenes iguales del reactivo calcium-binding (0,024% de o-cresolftaleína complexona y 0,25% 8-hidroxiquinolina) y de tampón cuya composición es 500 mM 2-amino-2-metil-1, 3 propanodiol y otros

estabilizadores no reactivos; esta solución se agregó a las muestras y a las soluciones patrones. La o-cresolftaleína complexona forma un complejo de color magenta con el calcio soluble, y este puede ser detectado mediante absorbancia, permitiendo la cuantificación del calcio en solución.

Para realizar la curva patrón se tomaron soluciones de concentraciones conocidas de  $\text{CaCl}_2$  (apéndice 10.5.4). Alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  de muestra o solución patrón se dispondrán en una placa transparente de 96 pozos junto con 80  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo preparada previamente, y se midió a una absorbancia de 575 nm, en un lector de placas TECAN.

La cantidad de calcio depositada se determinó calculando la concentración de calcio en solución por medio de la curva patrón y se multiplicó por el volumen de muestra, (apéndice 10.6.3). Los datos de la cantidad de sales de calcio depositadas fueron graficados haciendo sustracciones de los grupos que contenían células menos los grupos que no contenían células.

#### **4.9. Evaluación de la morfología celular**

Este parámetro se hace importante para evaluar las interacciones célula-material y la diferenciación osteogénica, pues las células madre durante este proceso cambiarán de una apariencia fibroblastoide a una cuboidal típica de los osteoblastos. Culminados los tiempos de cultivo estipulados, las muestras de diferentes composiciones fueron lavadas con PBS y fijadas en 3,7 % formalina por 10 min posteriormente se realizó dos lavados con PBS. Luego fueron lavadas con 0,1 % Triton-X 100 en PBS, y sucesivos lavados con PBS. Las células fueron marcadas por 20 min, con 2 unidades de faloidina BODIPY FL (Invitrogen), disuelto en albumina sérica bovina (BSA 1 % en PBS), este es una sonda fluorescente de alta afinidad por los filamentos de F-actina del citoesqueleto. Luego de los lavados con PBS, las muestras fueron visualizadas en un microscopio confocal marca Nikon TE2000 y se tomaron micrografías representativas de los diferentes cultivos. La excitación y emisión de la fluorescencia fue 558 y 569 nm, respectivamente.

#### **4.10. Análisis estadístico**

Para todos los experimentos, se realizaron tres muestras de cada concentración establecida en los cuatro tiempos diferentes: 4, 10, 16 y 21 días. Los valores se expresaron como el promedio de las muestras  $\pm$  desviación estándar (DE). Los datos se analizaron por ANOVA y múltiples comparaciones de pares, que se realizaron por el método de Tukey-HSD el cual tiene un nivel de confianza del 95 %.

## 5. RESULTADOS

En el presente estudio se analizó el potencial osteogénico *in vitro* de un sistema inyectable de quitosano fotosensible con hidroxapatita, utilizando cultivos de células madre mesenquimales (MSC) provenientes de la médula ósea de ratas, para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo. Para ello se realizaron modificaciones químicas al quitosano para hacerlo soluble a pH fisiológico y fotosensible. A partir del quitosano modificado se construyeron hidrogeles de quitosano/hidroxapatita (QT: HAP) a diferentes composiciones, evaluando su capacidad de gelificación bajo luz UV, para luego estudiar la diferenciación osteogénica de MSC sembradas sobre hidrogeles con las composiciones escogidas. A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada una de las etapas de este estudio, cumpliendo con los objetivos específicos planteados.

### 5.1. Modificación química del QT

Uno de los puntos de partida para el cumplimiento de los objetivos de este trabajo fue la elaboración de los hidrogeles de QT: HAP. Para ello primeramente se realizó una modificación química al QT, la cual consistió en una serie de pasos que comprendió dos etapas. La primera etapa comenzó con la disolución del QT a una concentración de 1,5 % p/v, en un medio ácido, la cual tenía un aspecto transparente y viscoso; posterior a ello, se realizó una modificación química al mismo, en donde se le adicionó LA al QT, a través de una reacción de carbodiimida, y la solución obtenida tuvo un aspecto transparente y menos viscoso; al liofilizar la solución, se obtuvo una especie de esponja de color blanco. La segunda etapa consistió en la adición de AZ, utilizando nuevamente una reacción de carbodiimida, la cual, al ser agregada, confirió a la solución que se tenía un color blanco,

ya que inicialmente era transparente. Posteriormente al liofilizar la solución se observó la formación de una esponja menos compacta a la obtenida luego de la modificación con LA. Una vez conseguido el liofilizado, se realizaron tres lavados con etanol absoluto, con la finalidad de descartar la AZ que no se incorporó a las cadenas de QT.

A partir de esta sección se referirá como QT al quitosano modificado con LA y AZ.

## 5.2. Construcción de los hidrogeles QT: HAP

Una vez que se modificó el QT, se procedió a establecer sus concentraciones de trabajo. El polímero fue disuelto a dos concentraciones (1 % p/v y 2 % p/v) en dos disolventes diferentes (agua destilada y PBS). En la tabla 2 se muestran las características de las soluciones formadas con QT a cada una de las concentraciones y los disolventes utilizados para su disolución.

**Tabla 2.** Características de las soluciones de quitosano a concentraciones de 1 % p/v y 2 % p/v en agua destilada y PBS.

Disolvente	QT al 1 % p/v	QT al 2 % p/v
Agua Destilada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápida disolución (aprox. 15 min)</li> <li>• Color transparente</li> <li>• Viscosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disolución rápida (aprox. 15 min)</li> <li>• Color transparente, amarillento</li> <li>• Altamente viscosa</li> </ul>
PBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disolución lenta (aprox. 1h)</li> <li>• Color transparente</li> <li>• Viscosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disolución lenta (aprox. 3h)</li> <li>• Color transparente</li> <li>• Altamente viscosa.</li> </ul>

Luego de disolver el QT se pasó a realizar los hidrogeles con ambas concentraciones del mismo (1 % p/v y 2 % p/v); se hicieron pruebas de gelificación con las soluciones que se tenían a

dos intensidades diferentes de luz UV (5000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  y 9900  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ), durante 3 minutos. Se observó que a una menor intensidad de luz UV, se obtuvieron hidrogeles más consistentes, por lo que se decidió utilizar la intensidad de 5000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ , así como también se observó que los hidrogeles de QT con una concentración de 2 % p/v, tenían una mayor consistencia.

Una vez conocida la intensidad óptima de luz UV (5000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) para la formación de los hidrogeles, se realizaron pruebas con diferentes tiempos de exposición a la luz UV, mostrando las características de cada hidrogel formado en la tabla 3. Una característica común de los hidrogeles de quitosano es que estos fueron de aspecto transparente.

**Tabla 3.** Características de los hidrogeles de QT formados, tanto con agua destilada como con PBS, a diferentes tiempos de exposición de luz UV, con una intensidad 5000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ .

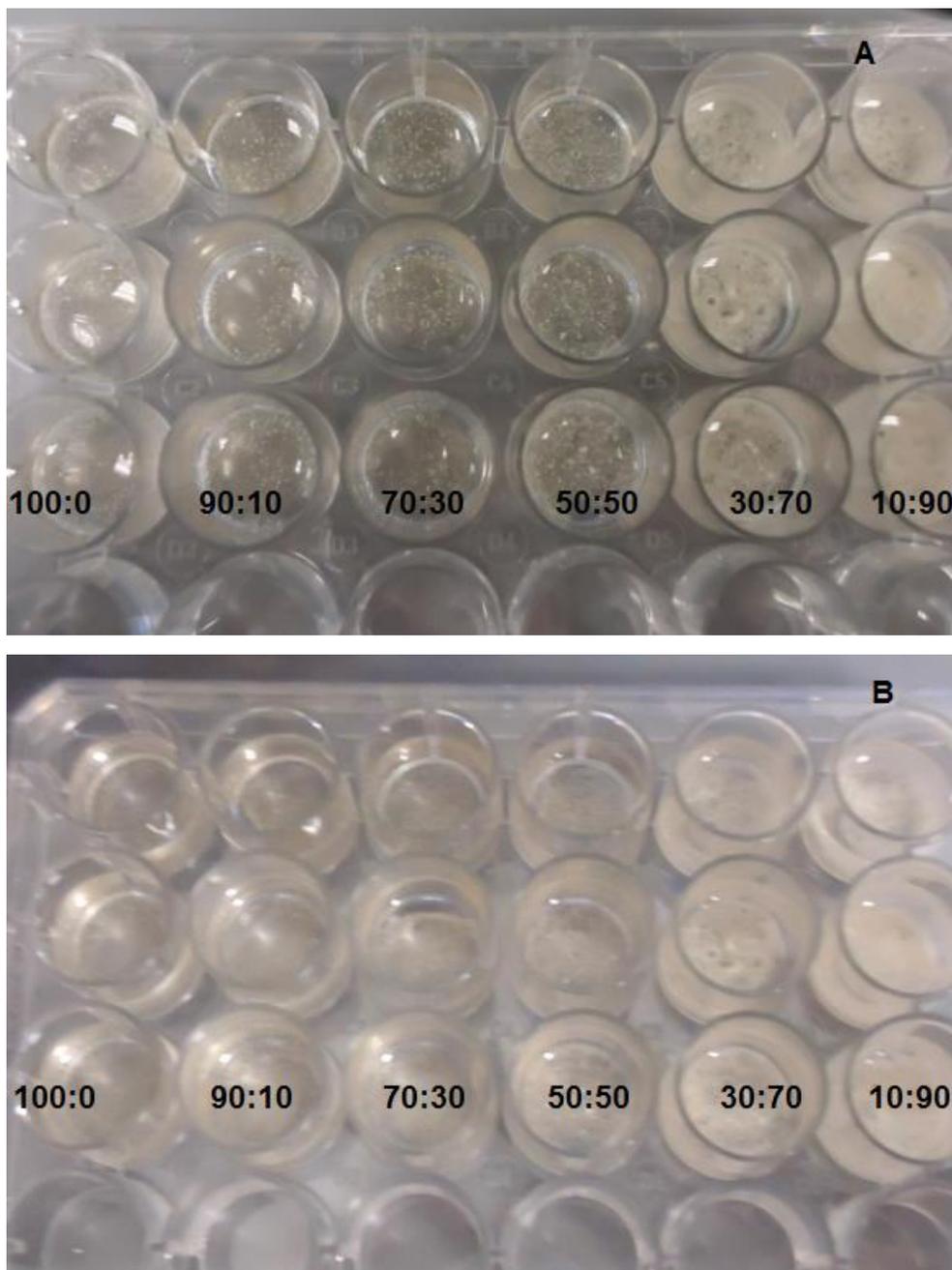
Tiempo de exposición a luz UV (5000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ )	Agua destilada (AD)	PBS
1 min	Se observó gelificación.	Se observó un hidrogel con poca gelificación.
1,5 min	Se observó gelificación del hidrogel, y fue más consistente que el anterior.	Se observó un hidrogel con poca gelificación.
2 min	Se observó un hidrogel de una consistencia bastante fuerte (manipulable).	Se observó un hidrogel de mayor consistencia que el anterior, pero menos manipulable que con AD.
2,5 min	La consistencia del hidrogel es bastante fuerte, se parece a la obtenida a los 2 min de exposición.	Se observó que el hidrogel formado iba tomando una consistencia dura, todavía menor que en AD.
3 min	La consistencia del hidrogel es bastante fuerte, similar a la obtenida a los 2 min. Pero parece más resistente.	Se observó que el hidrogel formado había gelificado bien y que era de una consistencia fuerte, sin llegar a parecerse a la consistencia obtenida con el hidrogel formado con AD.

Basados en estos ensayo, se decidió fabricar los hidrogeles en agua destilada, con un tiempo de exposición de 3 min. Posterior a estas pruebas, se procedió a formar hidrogeles de QT: HAP a diferentes composiciones. Se establecieron, basándose en literatura previa, cinco (5) relaciones de las mismas, las cuales fueron 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 (QT: HAP); con cada una de estas mezclas se formaron hidrogeles bajo las condiciones de luz UV previamente mencionadas. A estos hidrogeles se les hicieron observaciones diarias durante cuatro días continuos y posteriormente se revisaron luego de 24 días de incubación en PBS a 37°C; las características de dichos hidrogeles se muestran en la tabla 4

**Tabla 4.** Hidrogeles formados con las distintas composiciones de QT: HAP, disueltos en agua destilada, a 5000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ , durante 3 min de exposición, incubados en PBS a 37 °C.

Día	QT 100:0	Mezclas QT:HAP				
		90:10	70:30	50:50	30:70	10: 90
0	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color blanco Consistencia fuerte	Color blanco Consistencia fuerte
1	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color blanco Consistencia fuerte	Color blanco, Consistencia fuerte
2	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color blanco Consistencia fuerte	Color blanco Consistencia fuerte
3	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte Comienza a ver burbujas	Color blanco Consistencia fuerte	Color blanco Consistencia fuerte Comienza a ver burbujas
4	Color transparente Consistencia fuerte	Color transparente Consistencia fuerte Comienza a ver burbujas	Color transparente Consistencia fuerte Comienza a ver burbujas	Color transparente Consistencia fuerte Pocas burbujas	Color blanco Consistencia fuerte Comienza a ver burbujas	Color blanco Consistencia fuerte Grandes burbujas Comienzo a despegarse de placa
24	Color transparente Consistencia regular. Grandes burbujas	Color transparente Consistencia fuerte Pocas burbujas	Color transparente Consistencia fuerte Pocas burbujas	Color transparente Consistencia fuerte Pocas burbujas	Color blanco Consistencia fuerte Pocas burbujas	Color blanco Consistencia frágil Despegado de la placa

En la figura 6, se muestran hidrogeles con 2 y 24 días de incubación (en PBS a 37 °C), en donde se puede observar las características de cada uno de ellos en cuanto a su coloración, apreciándose poca variación de esta característica en el tiempo.

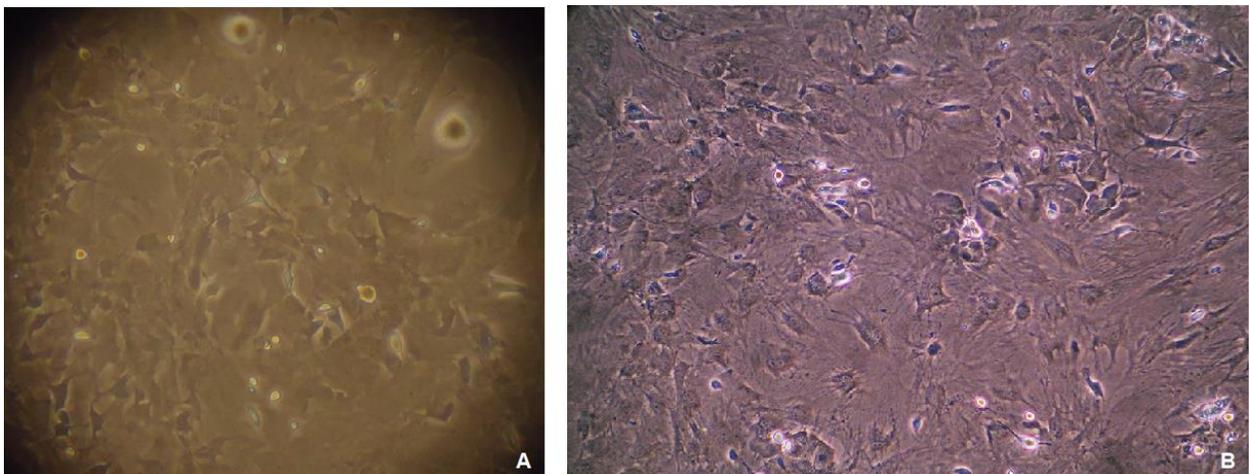


**Figura 6:** Hidrogeles de QT: HAP (100:0, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90), en PBS a 37 °C (A) Hidrogeles con dos días de incubación, (B) hidrogeles a los veinticuatro días de incubación.

### 5.3. Cultivo de Células Madre Mesenquimales de Médula Ósea de Ratas

El establecimiento de los cultivos de células madre mesenquimales (MSC) fue otro de los puntos de partida para el cumplimiento del presente trabajo. Las células fueron obtenidas como se explicó en la sección de materiales y métodos (sección 4.3.), en donde el aspirado medular se observó como un coagulo de sangre que fue fácil de disgregar, y al tener el pase 3, se obtuvo una población celular uniforme, repartida en placas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, la cual fue suficiente para el desarrollo de los experimentos (aproximadamente 12 millones).

Las MSC, en cada pase de proliferación, presentaron una morfología fibroblastoide característica (Heikey col, 2006), con un núcleo redondo bien diferenciado, y a algunas se les pudo observar los nucléolos; estas células mantuvieron la morfología fusiforme, fibroblastoide durante los tres pases de proliferación. Como se muestra en la figura 7.



**Figura 7.** Células madre mesenquimales de médula ósea de rata. Vista directa por uso del microscopio invertido. Aumento 100X. (A) Cultivo primario de células madre. (B) Segundo pase de proliferación de las MSC, 80 % de confluencia.

#### 5.4. Proliferación Celular

En el proceso de sembrado de las MSC, sobre los andamios, se colocaron estas sobre cada una de las diferentes composiciones de QT: HAP, dejando que las células se adhirieran a la superficie, esto durante media hora para luego agregar el medio de cultivo, teniendo este su color rojo característico; transcurrido 24 h, a unas placas se les retiro el medio y se les coloco el medio osteogénico, teniendo la misma coloración, y se realizaron cambios del mismo de forma interdiaria.

La coloración del medio se mantuvo igual durante todos los días de experimentación en la mayoría de las composiciones (100:0, 90:10, 70:30 y Pc), y en las composiciones 50:50 y 30:70 a partir del día 14 de cultivo la coloración del medio se comenzó a tornar anaranjada; hay que destacar que los hidrogeles con mayor contenido de HAP se degradaron rápidamente, al igual que los hidrogeles de composición 100:0, ya que a partir del día 14 de cultivo estos se desprendieron de las placas y comenzaron a fraccionarse.

Esto se pudo apreciar más claramente en los hidrogeles sin células, ya que su degradación fue mayor. Al igual que los andamios que se encontraban en medio  $\alpha$ -MEM en dónde, sin importar la composición de los mismos, a partir del día 12 comenzaron a desprenderse de las placas de cultivo y en el día 21 en las composiciones 50:50 y 30:70, el andamio se encontraba fraccionado. Durante el procesamiento de las muestras con el homogenizador, se observó que tanto los hidrogeles en medio  $\alpha$ -MEM, como los que no tenían células, se disgregaban en partículas finas; mientras que los hidrogeles en medio osteogénico de QT BPM y MPM no se rompieron completamente (quedaron trozos relativamente grandes). Una diferencia observada en los hidrogeles de BPM y MPM en medio osteogénico es la aparición de poros, que se observaron durante el desarrollo de la microscopía

confocal. En el grupo realizado con MPM, estos se observaron en el día 10 en las composiciones con mayor contenido de HAP (50:50; 30:70) y a partir del día 16 en el resto de las condiciones. En los hidrogeles de BPM, los poros estuvieron presentes desde el primer día de observaciones, resultando estos hidrogeles menos manipulables que los obtenidos con MPM.

El ensayo de proliferación celular se llevó a cabo con la finalidad de apreciar el crecimiento de las células en los hidrogeles, y obtener información que se pueda relacionar con el proceso de diferenciación osteogénica. Este ensayo permitió determinar el número de células presentes en un hidrogel en cada tiempo de evaluación. Una vez finalizados los períodos de cultivo establecidos, se realizó el proceso de lisis celular en un medio hipotónico, sometiendo las muestras a ciclos de congelado-descongelado, y usando un homogeneizador eléctrico, con la finalidad no solo de lisar las células que se encontraban en la superficie, sino también aquellas que pudieron haber migrado al interior del hidrogel.

Para ello se realizó un primer ensayo, en donde las células, una vez tripsinizadas y resuspendidas en medio, fueron contadas, y se determinó el volumen en el cual estaría contenido el número de células a sembrar ( $5 \times 10^4$  células). Alícuotas del volumen calculado fueron depositadas sobre las superficies de los hidrogeles. Se observó que en el día 4, en los hidrogeles de 100:0 y 50:50, en medio osteogénico, aproximadamente la misma cantidad de células que se sembraron inicialmente, mientras que la desviación en PC no permite establecer con precisión la cantidad de células presente. En el resto de las condiciones, en medio osteogénico, no se logró detectar células y la desviación estándar de los valores es grande, mientras que en el día 10 no se apreciaron células.

Con el medio  $\alpha$ -MEM, no se detectaron células en el día 4 para la mayoría de las composiciones. En los hidrogeles 30:70, aparece una señal de proliferación; sin embargo, la magnitud de la desviación estándar hace que esta sea inconclusa. Y en el día 10, se observan números significativos para las condiciones 100:0, 90:10, 70:30 y 50:50, con 70:30 presentando el más alto número de células (aprox  $140.000 \pm 25.000$ ). Se aprecia nuevamente una desviación estándar elevada para el caso de 30:70. Para ambos días, se encontraron números despreciables en el pozo control. Los resultados encontrados en esta primera ronda son inconclusos, y es por esta razón que se decidió repetir el experimento.

Para la segunda ronda se decidió modificar el procedimiento de sembrado. En este caso, las células se contaron previa resuspensión, y se disolvió el taco celular a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por cada 100  $\mu$ L de medio. También se decidió incorporar en esta oportunidad quitosano de peso molecular bajo (BPM), basándose en los resultados obtenidos de las tesis de maestría de la Ing. Denise Zujur (2013). En esta tesis se encontró que los hidrogeles con QT BPM presentaron características similares a los obtenidos con el QT MPM. Una diferencia significativa entre los hidrogeles con QT BPM y QT MPM, es con respecto a la gelificación, en donde los hidrogeles con QT BPM tuvieron mayor consistencia y menos rigidez que los de MPM. Las comparaciones entre diferentes pesos moleculares del quitosano en sistemas QT: HAP nunca antes han sido evaluadas.

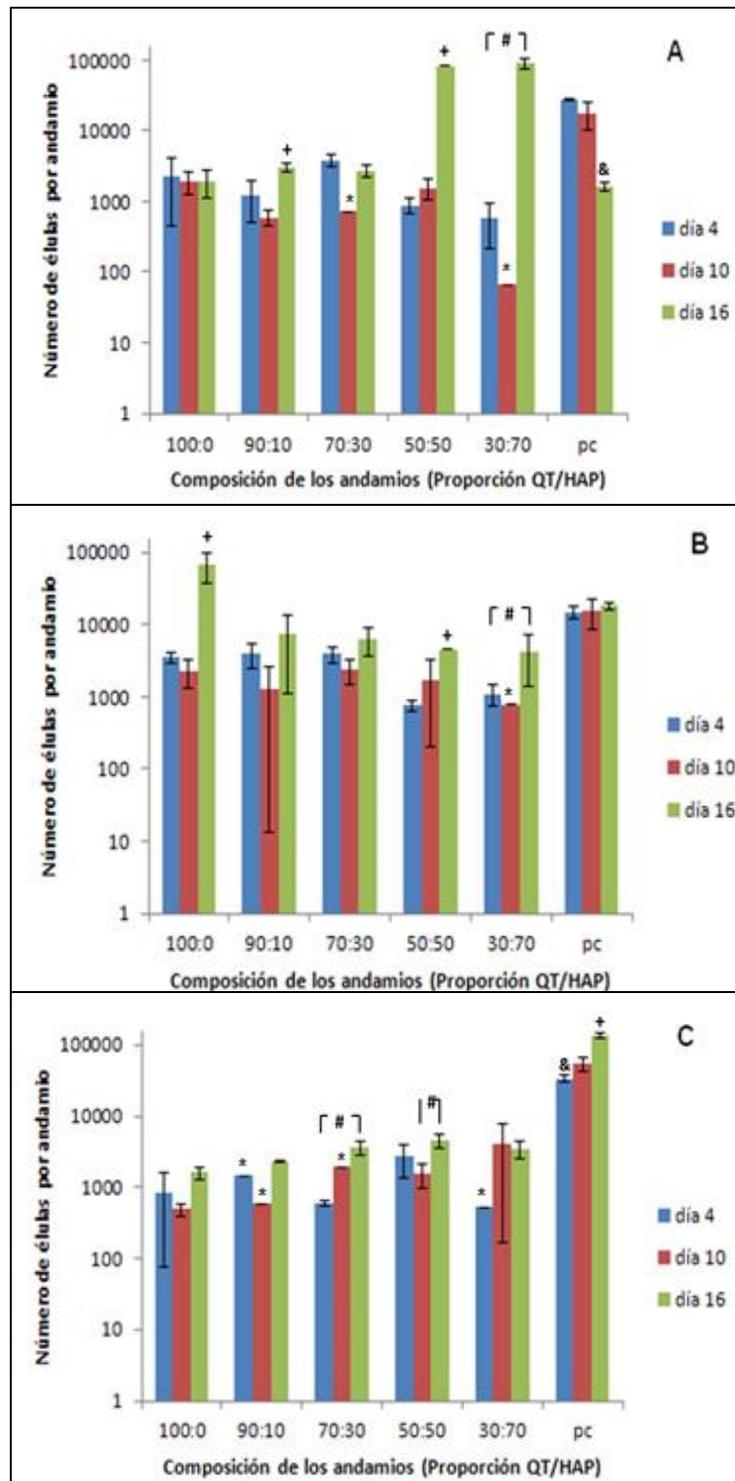
En la figura 8, se muestra los gráficos correspondientes a la proliferación celular que se obtuvo sobre cada una de las diferentes composiciones para esta segunda ronda experimental. El eje de las ordenadas (y) se encuentra en escala logarítmica en base 10, debido a las diferencias entre los grupos, para poder apreciar las tendencias sobre cada sustrato. La figura 8A representa la proliferación celular en los diferentes días de cultivo en medio osteogénico, teniendo como base para

la construcción de los andamios QT de peso molecular medio (MPM). En este gráfico no se observan diferencias significativas entre 100:0 y 90:10 en los días en que se realizaron las mediciones de proliferación; en los hidrogeles 70:30 y 30:70 se encontró una disminución del número de células desde el día 4 hasta el día 10, con un aumento significativo posteriormente en el día 16 ( $p < 0,05$ ). En la composición 50:50 se observó una tendencia a un aumento sostenido en cuanto al número de células en el tiempo, tendencia inversa a la encontrada en el pozo control (Pc). En esta gráfica, los más altos números de células se apreciaron el día 16 para las composiciones 50:50 y 30:70, alcanzando valores de  $(83.000 \pm 13.400)$  y  $(91.000 \pm 16.000)$  células, respectivamente.

En la figura 8.B, se representa la proliferación celular, en medio osteogénico, sobre hidrogeles con quitosano de peso molecular bajo (BPM); en donde en la mayoría de las condiciones hubo una disminución del número de células del día 4 al día 10 y posteriormente un aumento de las mismas en el día 16. Es solo en la composición de 50:50, al igual que con el QT MPM, en donde se observó una tendencia de aumento de la población celular; mientras que en el pozo control se observó que no había una variación significativa del número de células en los diferentes días de cultivo; sin embargo, los valores para este grupo fueron mayores que los encontrados sobre los hidrogeles, a excepción del número de células sobre la mezcla 100:0 en el día 16, el cual arrojó el máximo número de la gráfica ( $70.000 \pm 32.000$  células). En la figura 8.C, se observa el número de células en medio  $\alpha$ -MEM, con la base del QT de MPM, en donde en la composiciones de 100:0, 90:10 y 50:50 hubo una disminución de las mismas del día 4 al día 10 y un aumento en el día 16; en la composición 70:30 y pozo control hubo un aumento sostenido en el número de células, mientras que en la composición 30:70, hubo un aumento del día 4 al día 10 y para el día 16 no existió una

diferencia significativa en cuanto al número de células. Bajo estas condiciones de cultivo, el pozo control presentó el mayor número de células para cada uno de los días de medición.

Observando las tres figuras la única composición que presentó el mismo comportamiento es la de 90:10, en donde siempre hubo una disminución del número de células del día 4 al día 10 y un posterior aumento de las mismas en el día 16. No se realizaron las mediciones correspondientes al día 21 de cultivo debido a que no se observaron células en la microscopía confocal. En general, no se observan diferencias marcadas en los niveles de proliferación para las diferentes condiciones (QT BPM y QT MPM en medio osteogénico, y QT MPM en medio  $\alpha$ -MEM), y es importante destacar que el número de células obtenido en cada una de las condiciones fue mucho menor a las sembradas en los hidrogeles inicialmente y que solamente hubo una proliferación de estas en los pozos control en medio  $\alpha$ -MEM, en donde los valores obtenidos fueron aproximadamente el triple del inicial.



**Figura 8.** Gráfico de proliferación celular, segundo ensayo. Número de células en los hidrogeles a diferentes composiciones de QT: HAP a los 4, 10 y 16 días (A) Medio osteogénico (MPM). (B) Medio osteogénico (BPM). (C) Medio Alfa-MEM (MPM). Con n= 3 de cada una de las réplicas. (\*) Representa una sola medición de número de células. (+) y (&) Representan los días en los cuales se encontró el mayor y menor número de células para una misma composición, respectivamente. (#) p<0,05. Realizado por medio de la sustracción de los grupos con célula menos los grupos s/cél. Utilizando las ecuaciones que se muestran en el apéndice 10.6.1.

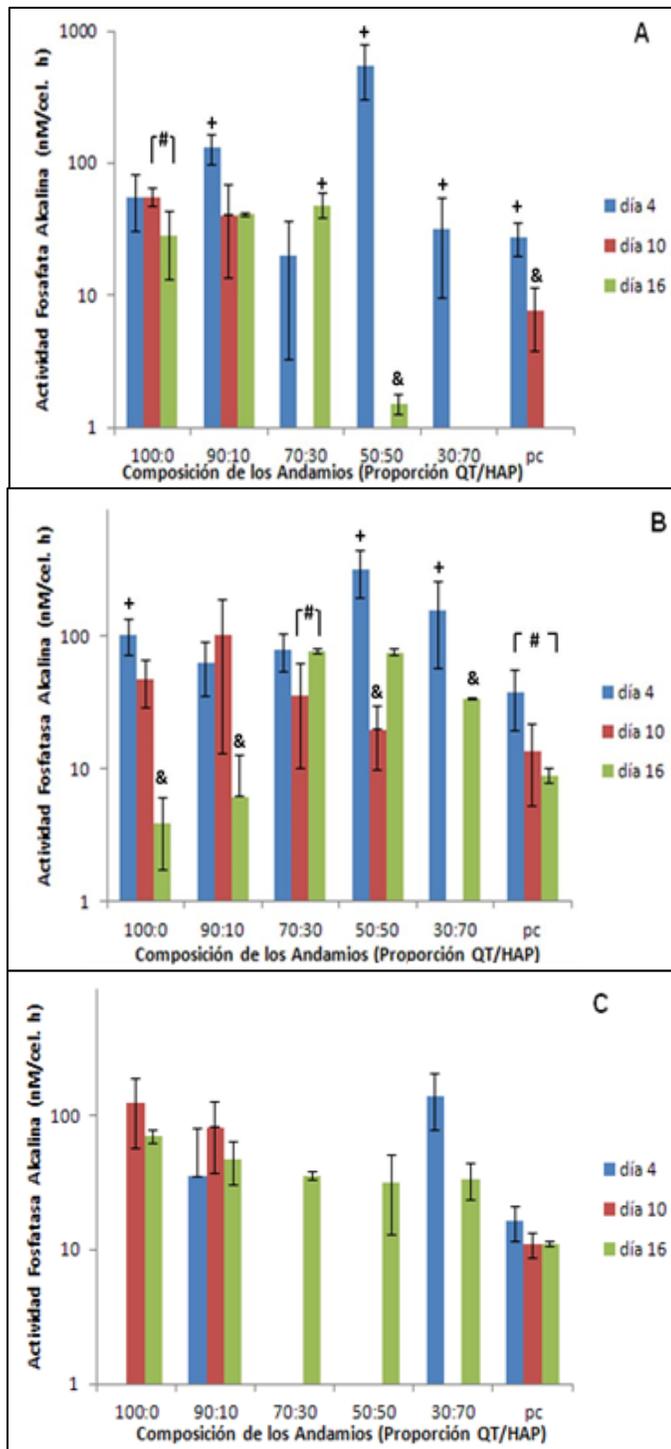
## 5.5. Actividad de la Fosfatasa Alcalina (ALP)

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés) es utilizada como un marcador de diferenciación osteogénica temprana. En la figura 9 se muestra la actividad de ALP para las diferentes condiciones experimentales de cultivo de células madre sobre los hidrogeles. Esta medición se realizó a partir de las mismas muestras utilizadas para evaluar la proliferación celular. En esta sección solo se muestran los resultados obtenidos en el segundo ensayo. El eje de las ordenadas (y) se encuentra en escala logarítmica en base 10, debido a las diferencias entre los grupos, para poder apreciar las tendencias sobre cada sustrato.

En la figura 9.A, se muestra los valores obtenidos de actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), en medio osteogénico con base de los hidrogeles QT de MPM, en donde la mayor actividad de esta enzima se presentó en la mezcla 50:50, siendo esta alrededor de  $(540 \pm 240)$  nM/cel.h, en el día 4 de cultivo, y no se observó actividad apreciable de dicha enzima para esta mezcla los restantes días de cultivo. Para las otras composiciones, en donde la ALP se encontró muy por debajo de este valor, para los hidrogeles correspondientes a 100:0, 90:10, 30:70 y el pozo control se tiene que el mayor valor de ALP fue en el día 4, la diferencia entre estos es que en el de 100:0, el valor de ALP se mantuvo invariable los días 4 y 10, mientras que en las otras mezclas disminuyó en los otros días de cultivo, en la mezcla 70:30, la actividad de esta enzima disminuyó el día 10 y repuntó al mismo valor del día 4 para el día 16

En la figura 9. B, se observa una tendencia muy parecida que en la figura 9. A.; la diferencia entre ambas es que el valor máximo de esta enzima, a pesar de seguir siendo en 50:50, se encontró en  $(322 \pm 127)$  nM/cel.h En la composición 90:10, la actividad ALP presentó su máximo valor  $(102 \pm$

89) nM/cel.h el día 10, con una disminución de dicha actividad en el tiempo. En el pozo control hubo una tendencia a la disminución de la actividad con el tiempo, presentando valores, en el día 4, generalmente menores a los obtenidos sobre los hidrogeles con mayores concentraciones de HAP (50:50 y 30:70). En la figura 10. C ( $\alpha$ -MEM), solo se observó un valor significativo en la actividad ALP para el día 4, correspondiente a las composiciones 90:10 y 30:70, encontrándose en esta última el mayor valor para este grupo de hidrogeles la cual fue de  $(142 \pm 64)$  nM/ce.h. Para el resto de los grupos de hidrogeles, se observó una actividad significativa a los 10 días para el caso de 100:0 y 90:10, y a los 16 días en el caso de 70:30 y 50:50. En el pozo control se obtuvieron valores de actividad de ALP bajos en comparación con los máximos encontrados sobre los andamios; sin embargo, hubo una señal apreciable en el día 4. Como no se realizaron mediciones de ADN en el día 21, tampoco se realizaron para la actividad de la fosfatasa alcalina.

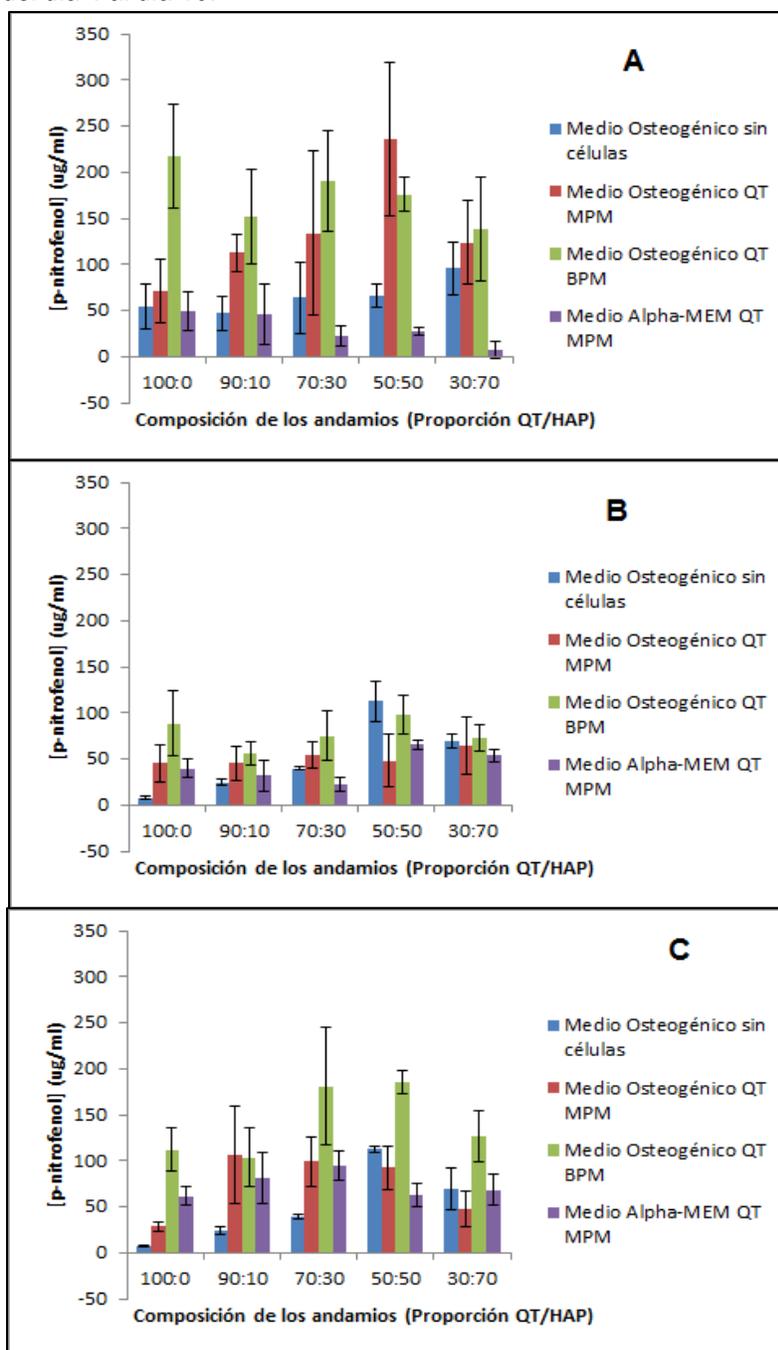


**Figura 9:** Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en el tiempo. (A) Medio osteogénico (MPM). (B) Medio osteogénico (BPM). (C) Medio Alfa-MEM (MPM). Con n= 3 de cada una de las réplicas. (+) y (&) Representan los días en los cuales se encontró la mayor y menor ALP para una misma composición, respectivamente. (#) p<0,05. Realizado por medio de la sustracción de los grupos con célula menos los grupos s/cél. Utilizando las ecuaciones que se muestran en el apéndice 10.6.2.

La figura 10 muestra la concentración p-nitrofenol en cada uno de los días de cultivo para las diferentes condiciones de peso molecular del quitosano y medio de cultivo utilizado; este parámetro es importante ya que es el que se obtiene directamente de la reacción del ensayo y permite hacer la medición de absorbancia en cada uno de los pozos. Estas gráficas, son elementales debido a que se muestra la concentración p-nitrofenol de los andamios sin células los cuales fueron mantenidos en medio osteogénico y en las mismas condiciones, y permiten determinar las posibles interacciones entre los componentes de los hidrogeles y los reactivos del ensayo. La figura 10. A, corresponde a las concentraciones encontradas en el día 4 de cultivo; a pesar de que los valores obtenidos en el medio osteogénico sin células para cada uno de los hidrogeles fueron menores que los encontrados sobre los hidrogeles que tenían células sembradas, la señal encontrada para este grupo fue significativa; este patrón se mantuvo para los días 10 y 16. En el día 4 hubo una tendencia a encontrarse mayores concentraciones en los cultivos en medio osteogénico, haciéndose significativa para 100:0 (BPM), 90:10 (BPM y MPM) y 50:50 (BPM y MPM). En general, los cultivos en alfa-MEM presentaron las menores concentraciones de p-nitrofenol.

Para el día 10 (Figura 10B), se observan patrones similares resaltando el hecho de que la mayor concentración se encontró en quitosano BPM, medio osteogénico, para todas las composiciones de hidrogel ensayadas. En el día 16 (Figura 10C) se mantiene este comportamiento para 100:0, 50:50 y 30:70. Para el QT-BPM en medio osteogénico se observó una disminución en la concentración con respecto al día 10 para 100:0 y 90:10, las condiciones con menor cantidad de hidroxiapatita. Es importante señalar un aumento en la concentración de p-nitrofenol para los cultivos en alfa-MEM del día 10 al día 16 para 100:0, 90:10 y 70:30, mientras que para 50:50 y 30:70 se

mantuvieron estadísticamente iguales. Estas dos últimas habían mostrado un aumento en concentración del día 4 al día 10.



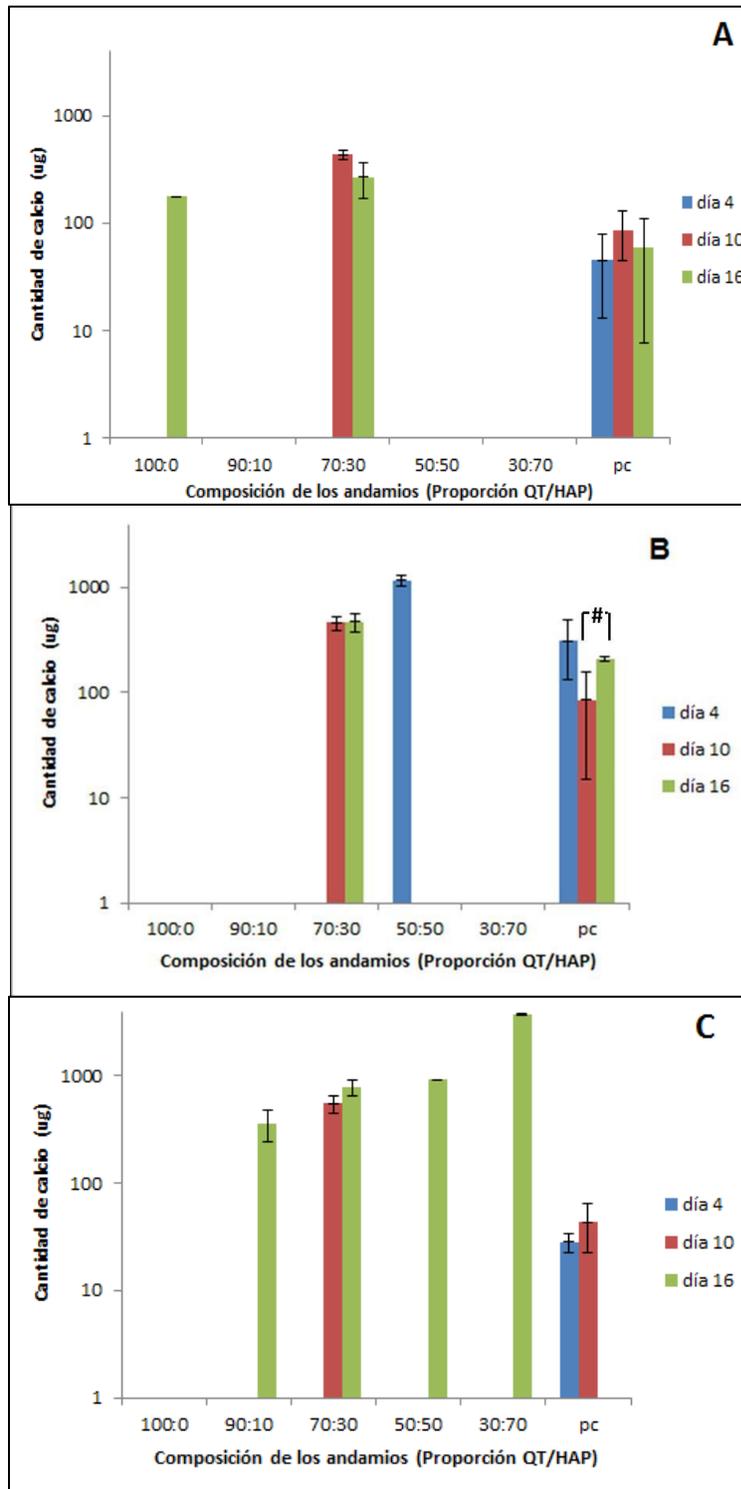
**Figura 10:** Concentración de p-Nitrofenol para cada una de las composiciones bajo las diferentes condiciones de cultivo (A) Día 4. (B) Día 10. (C) Día 16. Con n=3 de cada una de las réplicas. Estos valores se obtuvieron a partir de la primera ecuación del apéndice 10.6.2, que es para obtener [p-nitrofenol] por medio de la curva de calibración realizada.

## 5.6. Deposición de Calcio

La deposición de calcio es un marcador de diferenciación osteogénica madura. En la figura 11, se muestra la deposición de calcio en las distintas composiciones de los hidrogeles y medios utilizados. El eje de las ordenadas (y) se encuentra en escala logarítmica en base 10 debido a las diferencias entre los grupos, para poder apreciar las tendencias para cada sustrato. Los valores representados son producto de la sustracción del valor de los blancos (sin células) a la medición de cada uno de los sustratos con células.

En los hidrogeles de QT-MPM en medio osteogénico (Figura 11. A) se observa una deposición de calcio en el pozo control en todos los días de cultivo, mientras que en los diferentes hidrogeles se observó la deposición de calcio en 100:0 solo en día 16, y en la mezcla 70:30 en donde se obtuvo el mayor valor el día 10, manteniéndose para el día 16. Los niveles de calcio encontrados para esta composición fueron mayores que los encontrados en 100:0 y Pc. En la figura 11. B., en medio osteogénico con QT de BPM, se observa al igual que en la gráfica anterior una deposición de calcio en el pozo control en los tres días, sin diferencias significativas entre estas, mientras que los andamios correspondientes a las mezclas de 100:0, 90:10, 30:70 no se encontró deposición de calcio en ningún día de experimentación. En la composición 70:30, la cantidad de mineral depositado fue apreciable en los días de cultivo 10 y 16, en donde el valor obtenido es estadísticamente igual para ambos días ( $460 \pm 73 \mu\text{g}$ ;  $469 \pm 99 \mu\text{g}$  respectivamente). En los hidrogeles correspondientes a la mezcla 50:50, sin embargo, solo se observó la deposición de calcio el día 4, con desaparición de la señal para los días subsecuentes.

En la figura 11. C, la cual corresponde al medio  $\alpha$ -MEM con QT de MPM, en el hidrogel de 100:0, no se observó deposición de calcio en ninguno de los días de cultivo, en las composiciones 90:10, 50:50 y 30:70, solo se observa deposición de calcio el día 16, teniendo esta última el mayor valor de deposición de calcio el cual fue de  $(3737 \pm 5)\mu\text{g}$ , En la mezcla 70:30 se observó deposición de calcio los días 10 y 16, sin diferencias significativas entre ambos días, y en el pozo control al contrario de las figuras anteriores, la deposición de calcio, solo se observó los días 4 y 10, con valores de  $28 \pm 5\mu\text{g}$  y  $42 \pm 21\mu\text{g}$ , respectivamente.

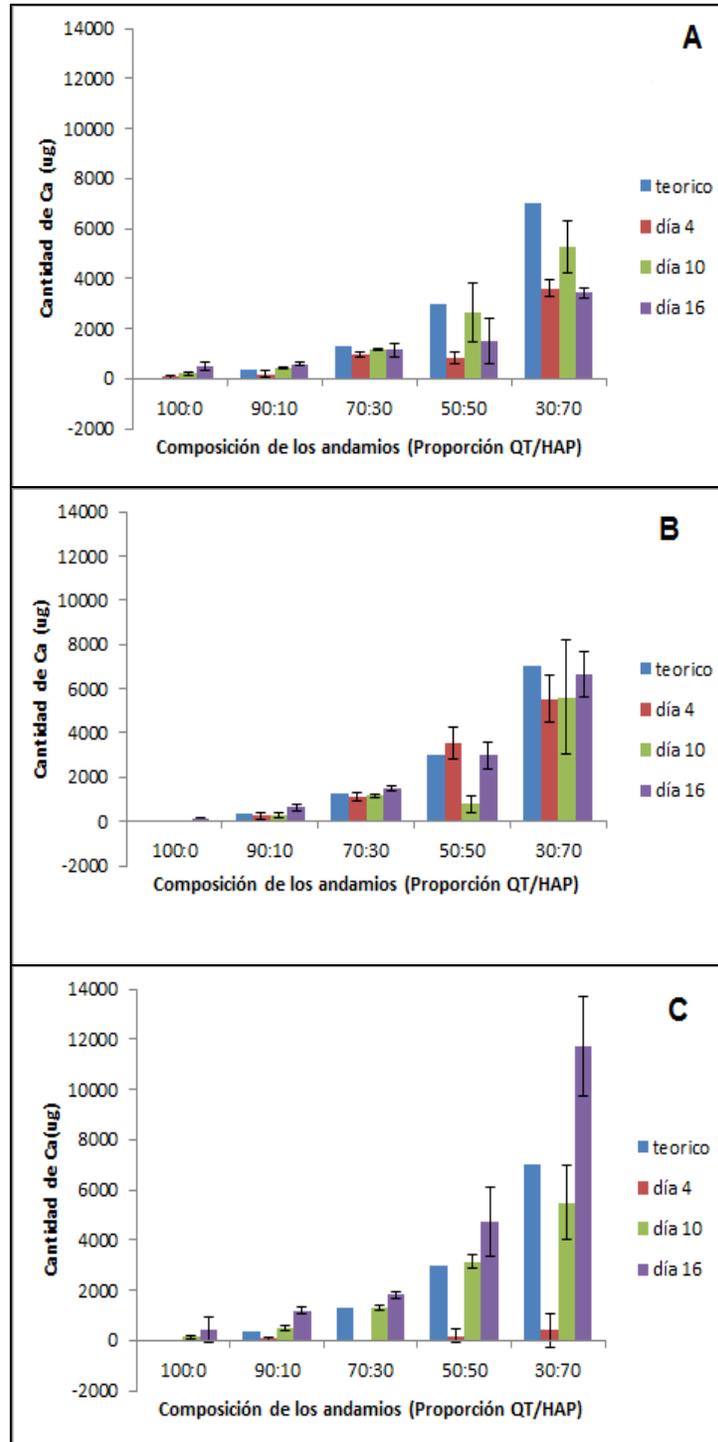


**Figura 11:** Gráficas de deposición de calcio en el tiempo. (A) Medio osteogénico (MPM). (B) Medio osteogénico (BPM). (C) Medio Alfa-MEM (MPM). (#)  $p < 0,05$ . Con  $n=3$  de cada una de las réplicas. Realizado por medio de la sustracción de los grupos con célula menos los grupos s/cél. Utilizando las ecuaciones que se muestran en el apéndice 10.6.3.

En la figura 12, se comparan los valores teóricos de calcio que contiene cada una de las diferentes composiciones de los hidrogeles (como se muestra un ejemplo en el apéndice 10.6.4), con los obtenidos por medición utilizando el método colorimétrico antes expuesto (hidrogeles sin células). En el caso de los andamios de quitosano MPM incubados en medio osteogénico (Figura 12 A), se pudo observar que para las concentraciones más bajas de hidroxiapatita (100:0, 90:10 y 70:30), los valores obtenidos fueron similares al esperado (teórico), y no hubo diferencias significativas entre los diferentes días de medición. Sin embargo, en los hidrogeles con un mayor contenido de hidroxiapatita se encontraron valores menores al teórico, con una gran variabilidad en el tiempo y desviaciones estándar significativas.

En la figura 12. B. correspondiente a medio osteogénico con QT de BPM, se observa un comportamiento más uniforme, con los niveles de calcio determinados, en todos los días de medición, similares al valor teórico estimado. Esto sucedió para todas las condiciones a excepción de la composición 50:50 en el día 10 en el cual se obtuvo un valor significativamente menor.

En esta gráfica se observa también mayor dispersión en los resultados obtenidos para la composición 30:70 (con el mayor contenido de HAP); aun así, los valores estuvieron dentro del rango esperado (parecido a los valores calculados teóricamente). En la figura 12. C, se muestran los valores obtenidos de la deposición de calcio en medio  $\alpha$ -MEM con QT de MPM, donde los valores de deposición de calcio que se tienen en los hidrogeles teóricos son mayores a los registrados solo en día 4 para todas las composiciones, aumentando la deposición de este mineral a partir del décimo día de cultivo todas las composiciones. Es notable la alta variabilidad en los valores obtenidos y la gran dispersión de los datos experimentales. Bajo estas condiciones, los hidrogeles obtenidos el día 10 son los que mejor se aproximan al valor teórico calculado.

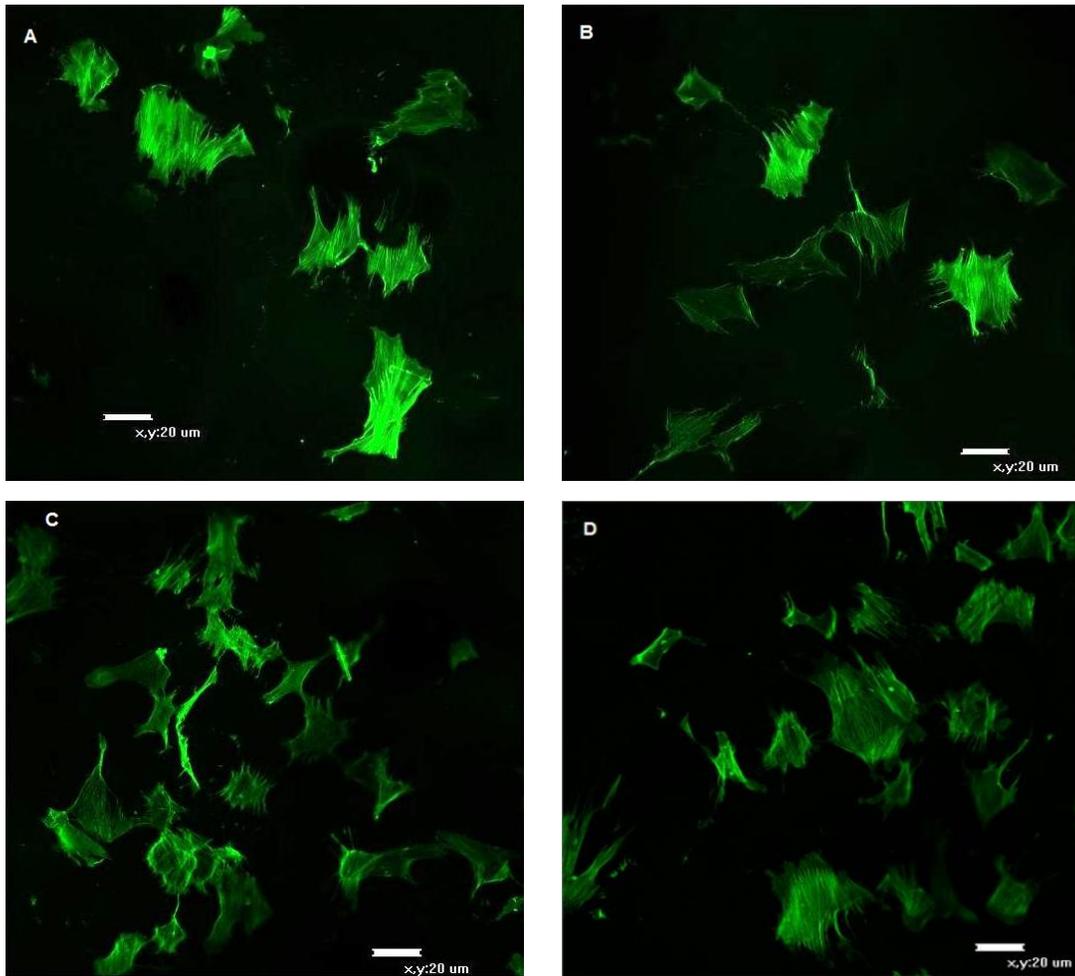


**Figura 12:** Gráficas de cantidad de calcio en el tiempo comparando con el valor teórico de calcio presente en cada una de las composiciones. (A) Medio osteogénico (MPM). (B) Medio osteogénico (BPM). (C) Medio Alfa-MEM (MPM). Con n=3 de cada una de las réplicas. Realizado por medio de la sustracción de los grupos con célula menos los grupos s/cél. Utilizando las ecuaciones que se muestran en el apéndice 10.6.3. Valor teórico obtenido como se muestra en apéndice 10.6.4.

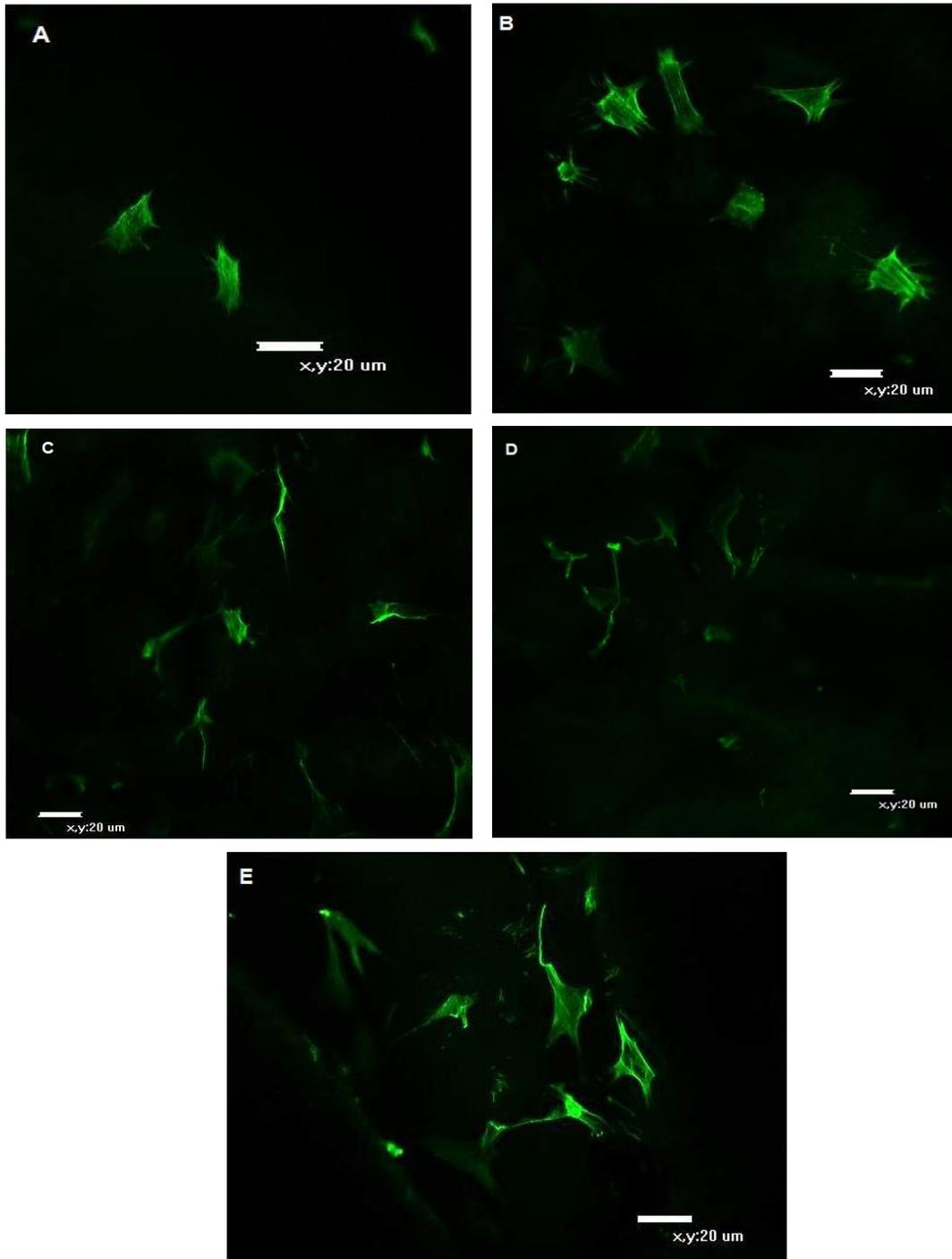
## 5.7. Evaluación de la Morfología Celular

Una vez sembradas las células sobre los hidrogeles, se puede evaluar las interacciones célula-hidrogel y corroborar el desarrollo del proceso de diferenciación celular a través de la evaluación morfológica de las MSC en los diferentes días de cultivo. Este ensayo se realizó a cada una de las composiciones de los diferentes hidrogeles, utilizando dos clases de quitosano (bajo y medio peso molecular). En cada una de las imágenes obtenidas, se observó una morfología cuboidal y ya al final de los días de experimentación se observan agregados celulares. Cabe destacar que en todas las composiciones de los hidrogeles la inducción de la diferenciación de las células se dio rápidamente como se muestra en las figuras 13, 14, 15 y 16, correspondientes a los días 4, 10, 16 y 21 días de cultivo, estas células fueron sembradas sobre los hidrogeles de cada una de las composiciones antes mencionadas, utilizando quitosano de peso molecular medio. En el día 4 (Figura 13), se observa que no hay diferencias en la morfología entre las diferentes composiciones, las cuales presentaron numerosos filopodios; sin embargo, es apreciable un aumento en la densidad celular superficial (número de células por superficie) a mayores concentraciones de HAP en el sustrato (70:30 y 30:70).

Para el día 10 (Figura 14), se apreció una disminución en la densidad superficial, pero fueron notables diferentes planos visuales cuando se desarrolló la microscopía, indicando que muchas de las células lograron penetrar la matriz. En este caso, se continuó apreciando una mayor densidad celular a más altas concentraciones de HAP, particularmente para 30:70.

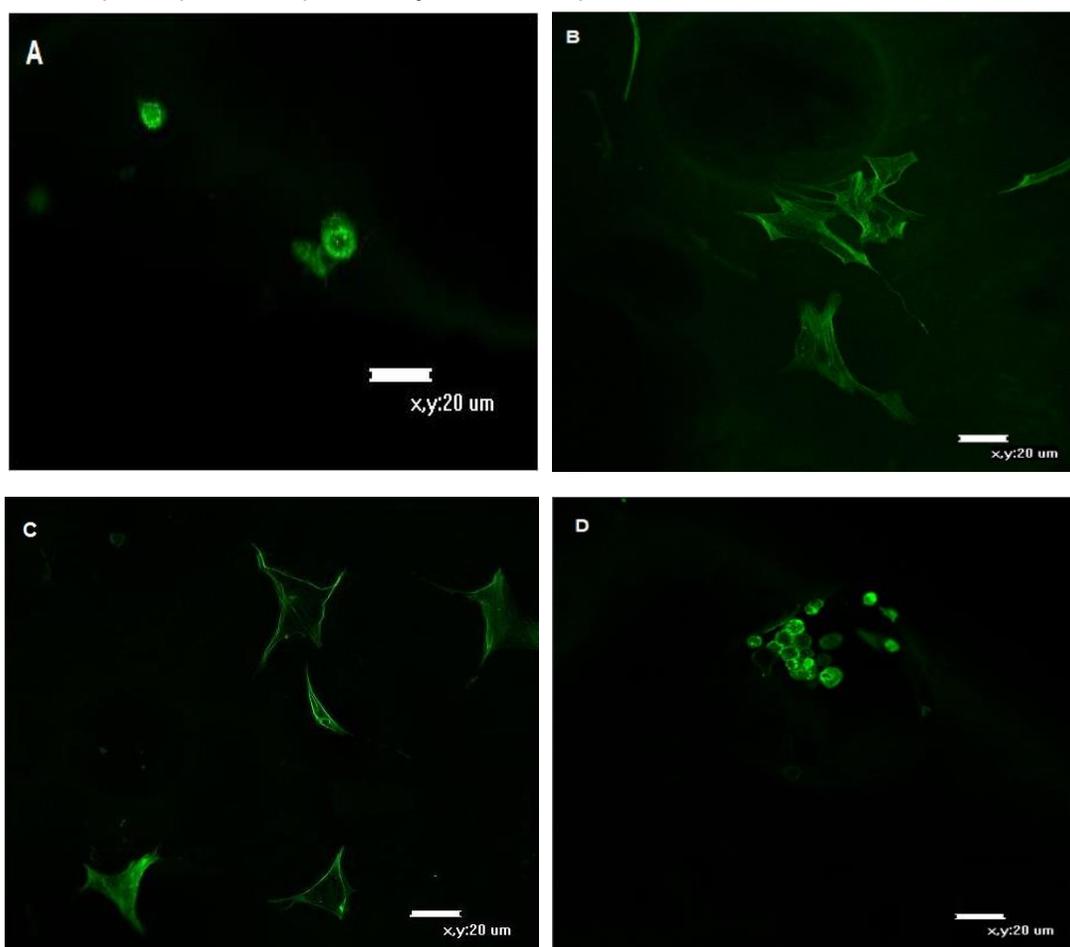


**Figura 13.** Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 4, utilizando QT de peso molecular medio, a diferentes composiciones: (A). 100:0, (B). 90:10 (C). 70:30 (D) 30:70. Las células marcadas con el fluoróforo BODIPY FL (Invitrogen) disuelto en BSA, el cual se une a los filamentos de actina, de las mismas.

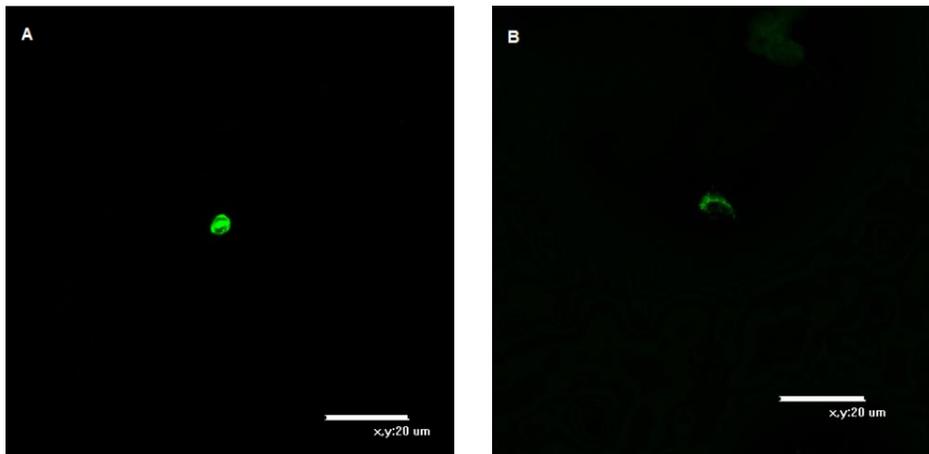


**Figura 14.** Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC sobre los hidrogeles QT: HAP, día 10, utilizando QT de peso molecular medio, a diferentes composiciones (A). 100:0, (B). 90:10, (C). 70:30 (D) 50:50, (E) 30:70. Las células marcadas con el fluoróforo BODIPY FL (Invitrogen) disuelto en BSA, el cual se une a los filamentos de actina, de las mismas

En el día 16 (Figura 15), se hizo notable la disminución en la densidad celular superficial, al igual que en el tamaño de las células, en especial para las composiciones 90:10 y 30:70. En esta oportunidad, la morfología fue más cuboidal y se observan agregados celulares, con mayor preponderancia en 30:70. Se pudo apreciar que muchos de los agregados observados se encontraban inmersos en poros que aparecieron después de cierto tiempo de incubación. En el día 21 (Figura 16), para el cual ya se apreciaba una degradación significativa de las matrices, se hizo difícil observar células en todas las condiciones. En la figura 16 se muestran ejemplos de las estructuras que se pudieron apreciar bajo el microscopio.



**Figura 15.** Evaluación morfológica, por medio de microscopía confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC, sobre los hidrogeles QT: HAP, día 16, utilizando QT de peso molecular medio, a diferentes composiciones. (A). 90:10, (B). 70:30, (C). 50:50, (D) 30:70. No se observaron células en 100:0. Las células marcadas con el fluoróforo BODIPY FL (Invitrogen) disueltas en BSA, el cual se une a los filamentos de actina, de las mismas

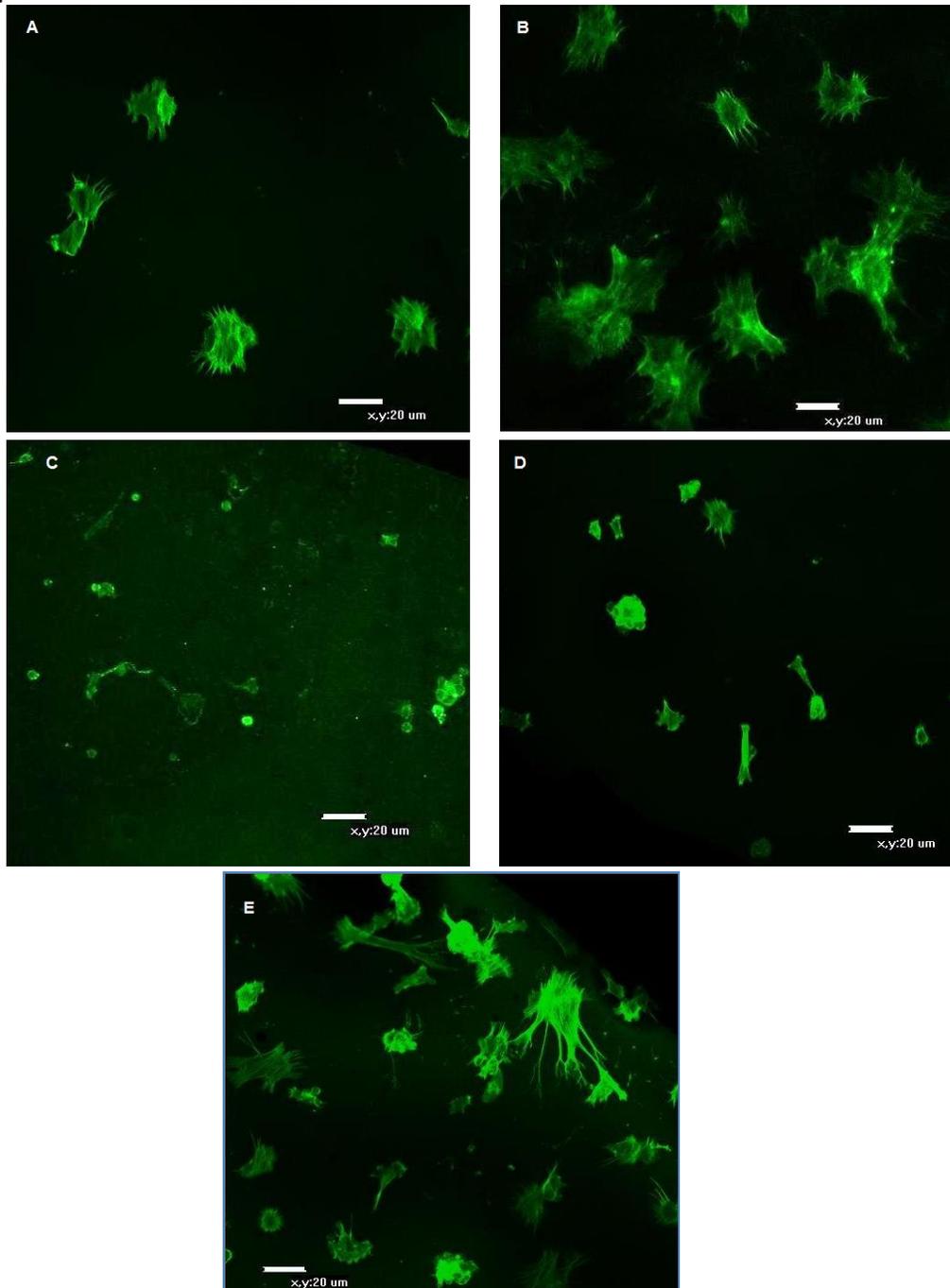


**Figura 16.** Evaluación morfológica por medio de microscopia confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC, sobre los hidrogeles QT: HAP, día 21, utilizando QT de peso molecular medio, a diferentes composiciones. (A). 70:30, (B). 50:50. Las células marcadas con el fluoróforo BODIPY FL (Invitrogen) disuelto en BSA, el cual se une a los filamentos de actina, de las mismas

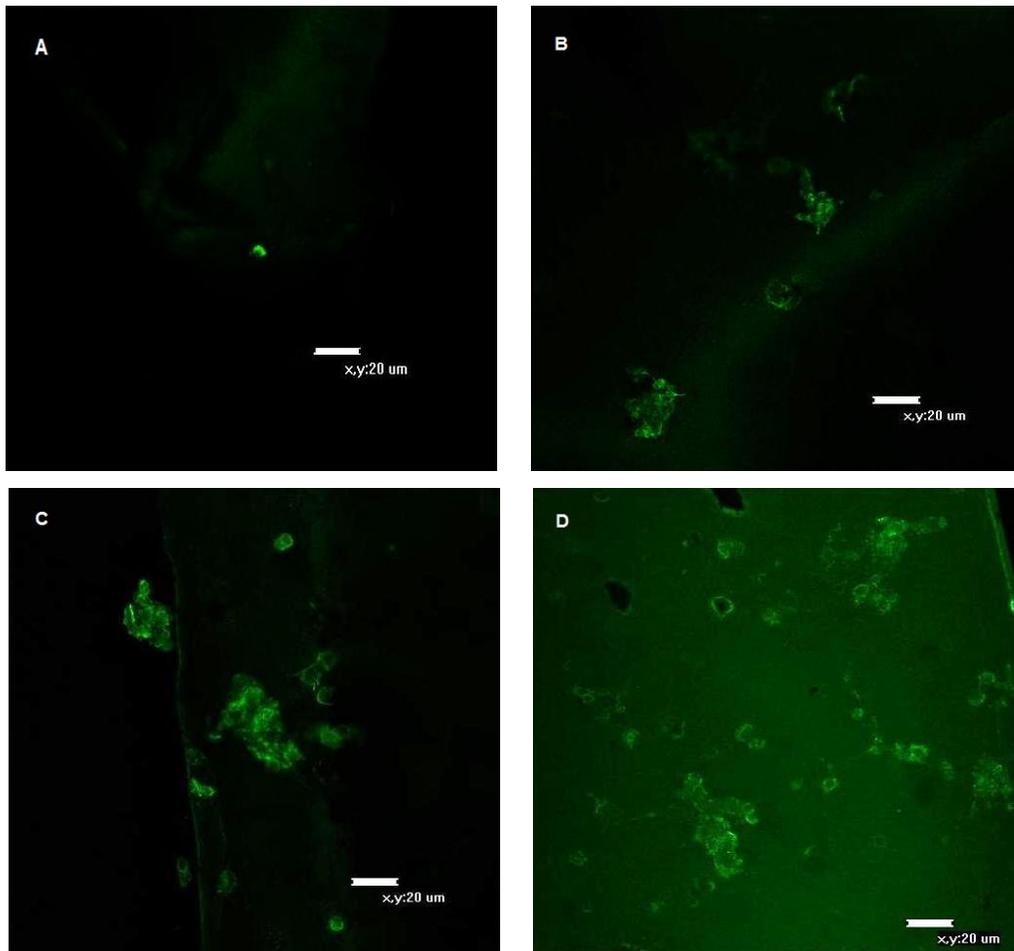
En las figuras 17-19 se observan las células sembradas sobre matrices hechas con QT BPM, bajo las mismas condiciones a la cuales se expusieron las mostradas anteriormente. En este caso se observaron diferencias marcadas con respecto a los resultados obtenidos en el QT MPM. A pesar de que la morfología celular fue similar en el día 4 (Figura 17), en este caso las células parecieron presentar una mayor cantidad de filopodios. Además de esto, fue aparente una disminución en su tamaño, que se hizo más pronunciada a mayores concentraciones de HAP (30:70, 50:50, y 70:30), En los hidrogeles 30:70 se observó un gran número de células dentro de la matriz, lo que dificultó su clara visualización.

Para el día 10 (Figura 18), se observó una disminución en la densidad celular superficial significativa, al tiempo de que una mayor cantidad de células parecieron estar en diferentes campos visuales, indicativo de penetración en la matriz. En este punto se comenzaron a observar conglomerados celulares, esta vez diferentes a los encontrados en la figura 15. Ahora las células presentaron una morfología más cuboidal en estos conglomerados, a diferencia de una más

redondeada observada en el caso de QT MPM. En este punto también se hizo evidente la formación de poros en la matriz.



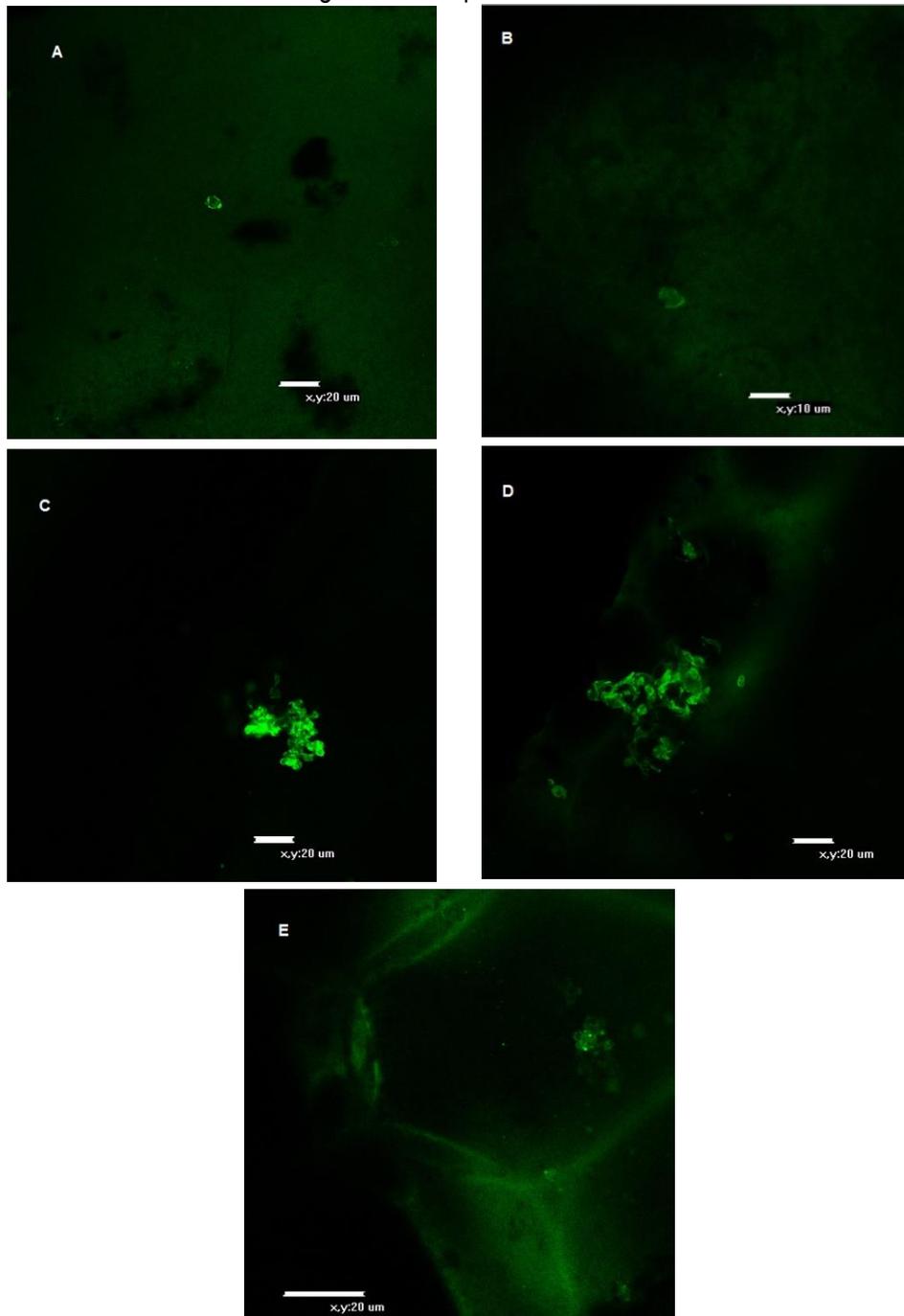
**Figura 17.** Evaluación morfológica por medio de microscopia confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC, sobre los hidrogeles QT: HAP, día 4, utilizando QT de peso molecular bajo, a diferentes composiciones. (A). 100:0, (B). 90:10, (C). 70:30, (D) 50:50, (E) 30:70. Las células marcadas con el fluoróforo BODIPY FL (Invitrogen) disuelto en BSA, el cual se une a los filamentos de actina, de las mismas



**Figura 18.** Evaluación morfológica por medio de microscopia confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC, sobre los hidrogeles: HAP día 10, utilizando QT de peso molecular bajo, a diferentes composiciones. (A). 90:10, (B). 70:30, (C) 50:50, (D) 30:70 QT: HAP. No se observaron células en 100:0. Las células marcadas con el fluoróforo BODIPY FL (Invitrogen) disuelto en BSA, el cual se une a los filamentos de actina, de las mismas

La visualización de las células se dificultó para los hidrogeles 100:0 y 90:10 para el día 16 (Figura 19 A y B); sin embargo se siguieron observando agregados celulares similares a los encontrados en el día 10, particularmente para las composiciones 30:70 y 50:50. La aparición de poros se hizo aún más pronunciada, mostrándose poros de mayor tamaño (no mostrados). Un punto importante a destacar sobre la dureza de estos hidrogeles, es que estos fueron menos resistentes que los hidrogeles obtenidos con el quitosano de medio peso molecular, por lo que su manipulación

fue mucho más difícil, ya que los hidrogeles formados se rompían al levantarlos de la placa de cultivo, dificultando la obtención de imágenes correspondientes al día 21 de cultivo.



**Figura 19.** Evaluación morfológica por medio de microscopia confocal, de la diferenciación osteogénica de las MSC, sobre los hidrogeles QT: HAP, día 16 utilizando QT de peso molecular bajo, a diferentes composiciones. (A). 100:0(B). 90:10, (C). 70:30, (D) 50:50, (E) 30:70. Las células marcadas con el fluoróforo BODIPY FL (Invitrogen) disuelto en BSA, el cual se une a los filamentos de actina, de las mismas

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La ingeniería de tejido óseo en los últimos años ha tenido un gran avance ya que se propone como alternativa para la regeneración de tejidos dañados por traumatismos o patologías. El paradigma de esta área se basa en tres componentes principales: un componente celular, los biomateriales que se pueden encontrar en forma de hidrogeles los cuales son idealmente tridimensionales y factores de crecimiento los cuales modulan las respuestas celulares. El conjunto de estos tres componentes es el producto final para la utilización en la regeneración o sustitución del tejido. El uso de células madre mesenquimales se ha propuesto en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo debido a su fácil obtención, y su capacidad proliferativa y de diferenciación osteogénica. Sin embargo, en el caso de aplicaciones prácticas, estas deben ir acompañadas de un biomaterial que pueda soportar su adhesión, proliferación y diferenciación, al mismo tiempo en que presenta características importantes como biocompatibilidad, degradación y conductor de la formación del tejido, entre otras.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales de rata, provenientes de médula ósea, sobre los hidrogeles de quitosano/hidroxiapatita (QT: HAP) con la finalidad de proponer esta combinación de dichos biomateriales para la regeneración de tejido óseo, siendo esta una propuesta novedosa, poco invasiva y de poca toxicidad, en comparación con algunas de las terapias utilizadas actualmente en la ingeniería de tejido óseo. Teniendo en cuenta que la estimación de la diferenciación osteogénica se basa en diferentes marcadores, los cuales pueden definir las etapas involucradas en la diferenciación *in vitro*; estos también pueden ser medidos en procesos *in vivo*. En este trabajo se midieron marcadores claves como lo son la proliferación celular, actividad fosfatasa alcalina (ALP) y la deposición de sales de calcio, además de evaluar la morfología celular durante el proceso de diferenciación. Sin embargo, por ser este un campo multidisciplinario, este trabajo va más allá de la evaluación biológica de los cultivos de las MSC sobre los diferentes biomateriales, involucrando la preparación y cierta caracterización de los hidrogeles utilizados como soporte para el cultivo de las células en la inducción de la diferenciación osteogénica. A continuación se discuten los resultados obtenidos

## 6.1. Modificación química del QT.

Uno de los objetivos principales de este trabajo consistió en la modificación química del QT que conlleve a una alternativa menos tóxica a las utilizadas tradicionalmente en la producción de hidrogeles entrecruzados con QT, debido a que los agentes entrecruzantes más frecuentemente empleados son: la apiclorhidrina y los dialdehídos como el glutaraldehído y el glicosil, que a pesar de tener una eficiencia reticulante elevada y bajo costo, son sustancias que no son adecuadas biológicamente dada la citotoxicidad de sus productos finales (Berghoff. 2011). En este trabajo no se utiliza agente entrecruzante químico, sino que se produce un foto-entrecruzamiento en presencia de luz UV; además de esto, se ha modificado para hacerlo soluble a pH fisiológico puesto que el QT es generalmente soluble en medio ácidos. En la modificación química del QT se utilizó el EDC, que va a servir como un intermediario para dicha reacción de modificación, ya que este se adiciona tanto con el LA así como con la AZ. El EDC es una carbodiimida reticulante de uso común en la química de péptidos. Este es un compuesto orgánico caracterizado por el grupo funcional  $RN=C=NR$  en el que puede unir químicamente dos o más moléculas a través de un enlace covalente (Andreu, y col. 1997). El EDC se utilizó como agente activador de los ácidos carboxílicos presentes tanto en el LA como en el AZ, permitiendo la formación de un enlace amida entre los compuestos, tal y como se ilustra en la figura 20 (Usha y col. 2012).

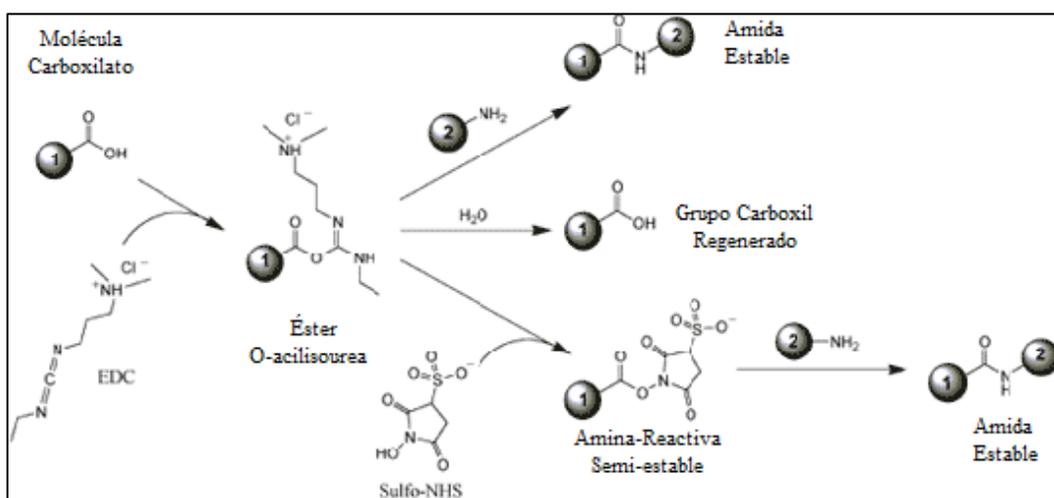


Figura 20. Esquema de la reacción química de la carbodiimida (EDC). Tomado y modificado de: <http://www.piercenet.com>.

La participación del EDC con el LA o AZ, es para producir un producto intermediario (O-acilisourea), el cual es un éster carboxílico con un grupo saliente activado. Este va a reaccionar con una amina del QT para producir así una amida, y de esta manera llevar a cabo la modificación química respectiva (Zujur, 2013).

Cabe destacar que al ser el EDC un reticulador de longitud cero, es decir que ninguna parte de su estructura química se encuentra en el producto final de reacción entre las moléculas, siendo esta una característica de las carbodiiminas, y es la principal diferencia de otros agentes reticuladores. (Park y col. 2002, Hao y col, 2011).

Se conoce que el LA, se introduce en las cadenas de quitosano en una proporción del 40 % del total suministrado, siendo esta proporción de intercalado suficiente para que el QT sea soluble en agua, y a pH fisiológico, y alrededor de 2 - 2,5 % de los grupos aminos de la molécula de QT son reemplazados con el LA (Ono y col. 1999, Ishihara y col. 2002 Obara y col. 2003).

En cuanto al mecanismo de unión del LA y la AZ al QT se conoce que ocurre a través del acoplamiento entre el grupo carboxilo del ácido lactobiónico o ácido azidobenzoico y el grupo amino disponible de la cadena del QT, por medio de la presencia del EDC, tal y como se muestra en la figura 21 (Zhan y col. 2011). Para que esta reacción se pueda llevar a cabo es necesario que se encuentre en medio ácido (pH 4,75 – 5,6), ya que este pH va a favorecer la desprotonación de los grupos aminos, liberando así hidrogeno y promoviendo la formación de la amida. Además, ambas modificaciones de QT tanto para LA como AZ se produce entre QT-NH<sub>2</sub> y el producto intermediario formado con el EDC, pero se conoce que este producto tiende a formar N-acilurea, un producto que se ve favorecido a pH neutros o ligeramente alcalinos (Zujur. 2013)

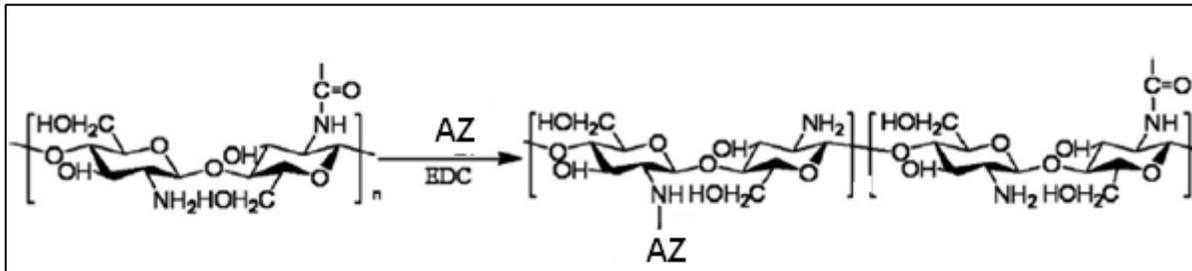


Figura 21. Ruta de la síntesis del quitosano modificado con azida. Tomado y modificado de Zang y col. 2011.

En la figura 22 se muestra el mecanismo propuesto por Rickett y colaboradores (2011), en donde indica que la exposición del QT modificado bajo luz UV produce la liberación de nitrógeno lo cual resulta en una conversión fotolítica, para formar grupos nitreno reactivos; posteriormente, estos grupos nitrenos generan una expansión de anillo y reaccionan con aminas vecinas en la cadena del quitosano para formar redes intermoleculares e intramoleculares produciendo, de esta manera, el entrecruzamiento del polímero y por lo tanto el hidrogel.

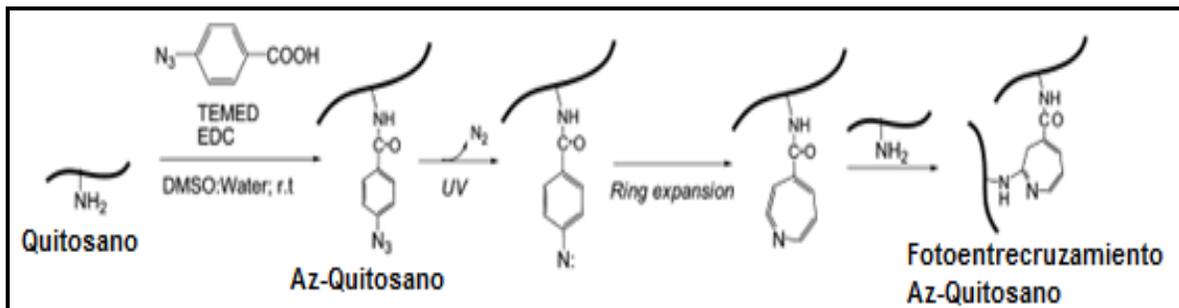


Figura 22. Esquema de la conjugación de quitosano con azida utilizando la química de carbodiimida, con EDC como mediador. Tomado y modificado de: Rickett y col. 2011

Durante las modificaciones realizadas del QT se utilizó TEMED, siendo su principal efecto formar un buffer con el HCl presente en la solución, así como la promoción de la reacción de modificación. Para la formación de los hidrogeles se utiliza foto-entrecruzamiento que se va a

producir entre las cadenas poliméricas del quitosano, siendo esta una alternativa menos tóxica que las más comúnmente utilizadas.

## **6.2. Construcción de los hidrogeles QT: HAP**

Para utilizar andamios en ingeniería de tejidos, estos deben cumplir una serie de condiciones que permitan su adecuado desempeño en aplicaciones terapéuticas, tales como permitir la adhesión, proliferación y diferenciación celular, además de los aspectos relacionados directamente con las propiedades mecánicas del hidrogel. Este debe ser capaz de sobrellevar las demandas mecánicas involucradas en su proceso de manipulación, incluyendo la esterilización y preparación previa para la siembra de las células, además de mantener su integridad durante el proceso de cultivo *in vitro* (Pal. y col. 2009).

El hidrogel utilizado en este trabajo tiene QT como componente principal, con la encapsulación de nanopartículas de HAP, en distintas proporciones (90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90), dentro de este entramado molecular. Es importante recordar que para la construcción de los hidrogeles no se utilizó un agente entrecruzante tóxico, sino que el entrecruzamiento se llevó a cabo por medio de una reacción de fotopolimerización entre las cadenas del quitosano. La interacción que ocurre entre las mezclas de QT: HAP han sido estudiadas por dos autores anteriormente (Zhang y col. 2005 y Teng y col. 2007). En donde se encuentra que existe una fuerte interacción entre los dos componentes, ya que las mezclas formadas no presentaron separación de fases; y que al formar la matriz de QT las partículas de HAP quedan dispersas en la mezcla de forma uniforme. Sin embargo, en ambos estudios, la HAP sintética fue combinada con QT que se encontraba en condiciones nativas y no modificado como se propuso en este trabajo; por lo que sus interacciones no se encuentran claras. Para efectos de esta discusión se asume que la HAP solo queda atrapada dentro de las redes poliméricas del QT, sin interactuar con dichas cadenas, pero es factible que, debido a la exposición a la luz UV, se generen otros mecanismos de interacción entre ambos componentes.

El QT se disolvió más fácilmente en agua destilada, que en PBS, debido a que este último es un buffer que contiene una cantidad de sales, liberando electrolitos en el medio que podrían

interactuar con las cadenas de quitosano y por lo tanto, disminuir la solubilidad del mismo, debido a que aumenta la fuerza iónica del medio, pudiendo llegar a la precipitación (Errington y col., 1993). Y al agregar electrolitos el medio, se ve reducida la solubilidad del QT. Cuando la concentración de electrolitos en el medio es elevada, hay una sobre-saturación, por lo que va a precipitar el QT en la solución (Skaugrud, 1991).

La decisión de utilizar geles en una concentración del 2 % p/v se debe a que, al formar el hidrogel a esta concentración, este presentó una mayor consistencia, considerándose así que esta sería la concentración más idónea al momento de tener una mejor resistencia y estabilidad del hidrogel en medio acuoso. Es importante recalcar que se han fabricado hidrogeles de QT a una concentración de 30 o 40 mg/ml; la concentración propuesta en el presente trabajo utiliza una menor cantidad del QT y pareció, inicialmente, tener durabilidad y resistencia aceptables.

En cuanto a la intensidad de luz UV utilizada y elegida, la de menor intensidad probada ( $5000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) fue mediante la cual se obtuvieron mejores resultados, en término de la apariencia macromolecular de los hidrogeles, además de que dicha intensidad de luz UV no causa daños a nivel metabólico celular, ya que a nivel médico-odontológico se utiliza una intensidad de luz de 5 - 10  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (Ottenbrite y col. 2010), lo que representa una intensidad mucho mayor a la propuesta. El tiempo de gelificación utilizado no afecta al nivel metabólico, debido a la baja intensidad, además este proporciona la seguridad que todos los grupos nitreno reactivos del QT modificado han reaccionado; como se demostró en Zujur (2013) por medio del uso de resonancia magnética nuclear (RMN). Otros investigadores han utilizado sistemas fotoentrecruzables para encapsular diferentes tipos de células como mesenquimales y condrocitos, exponiéndolas a condiciones de luz UV similares a las empleadas en este estudio, y demostrando la viabilidad de las mismas en cultivos a largo plazo (más de 10 días); como lo realizaron en Fedorovich y colaboradores (2009), Mazzoccoli y colaboradores (2010) Park y colaboradores (2013) y Coates y colaboradores (2013). Por lo tanto, se puede asumir con un grado de confiabilidad que el sistema propuesto no supone altos niveles de toxicidad y efectos secundarios mínimos al tejido circundante a la zona en la que se aplicaría.

Para el establecimiento de las distintas combinaciones de QT: HAP que se utilizaron, se hicieron pruebas de gelificación a formulaciones de algunas mezclas que se habían ensayado

anteriormente por otros investigadores en sistemas diferentes con estos componentes (Zhang y col. 2005; Teng y col. 2007). Es importante destacar que en ninguno de estos trabajos se utilizó quitosano fotosensible, ni se realizaron ensayos con duración de 21 días, por lo tanto hubo que prestar atención a la integridad de los hidrogeles formados, en donde se destaca que todas las mezclas tienen una gran durabilidad en el tiempo, ya que todos los hidrogeles se examinaron transcurridos 24 días y su apariencia macroscópica no pareció ser afectada. Sin embargo, se escogieron 4 de estas, descartando la última de las combinaciones (10:90), ya que al día 4 se observó que el hidrogel se desprendía de la placa de cultivo, lo que potencialmente afectaría los resultados que se obtengan con algún cultivo celular. Además dicha composición representa una mayor incorporación de HAP, el material más costoso de esta combinación, y en este estudio se mantuvo la visión de aprovechar principalmente un material de desecho en el mundo, como lo es el exoesqueleto del camarón, y que es también de producción nacional. Y que al tener una mayor cantidad de HAP el hidrogel formado no es muy resistente en el tiempo, perdiendo así su conformación, esto es posiblemente al impedimento de las cadenas del QT para unirse, causado por la HAP.

### **6.3. Cultivo de células madre.**

El aislamiento de las células madre mesenquimales a partir de médula ósea de ratas ha sido ampliamente estudiado y caracterizado. Debido a que este tipo de células poseen características, que las hacen sencillas de separar de los otros tipos celulares que se allí se encuentran (células hematopoyéticas, así como células ya diferenciadas en linajes condrogénicos y osteogénicos), como lo son la adherencia a las placas de cultivo, así como presentar antígenos de superficie de células mesenquimales CD105 y CD173 (Caplan y col, 1998; Arévalo, 2007; Álvarez-Barreto y col. 2011; Álves y col. 2011).

Inicialmente se obtuvo un cultivo primario a partir del aspirado de médula ósea de rata, el cual tenía una población heterogénea de células; este tenía una gran cantidad de detrito celular y fue eliminando en su mayor parte al realizar un lavado con PBS estéril transcurridos unos días del establecimiento del cultivo y el restante con los cambios de medio interdiario realizados. Al tener una

monocapa que cubre entre 70 – 80 % de la placa, las células van a entrar en contacto entre ellas, agotándose los nutrientes y acumulándose sustancias de desecho, las cuales van a influir en el proceso de proliferación; siendo este el momento en que se realiza el pase de proliferación (subcultivo) para así asegurar las condiciones óptimas para el mantenimiento de los mismos. (Sharp, 1980). Los subcultivos aumentan rápidamente la población celular, por lo que al ir realizando los subsiguientes pases de proliferación, la población celular se fue haciendo más homogénea.

Previamente Álvarez-Barreto y col. 2011, utilizando el mismo protocolo de extracción de MSC, caracterizaron dichas células, por medio del uso de citometría de flujo, debido a que las células aisladas eran positivas para un número específico de marcadores de superficie y negativas para los marcadores hematopoyéticos

En los cultivos celulares realizados se observó, después del quinto día de cultivo, la presencia de células de morfología fibroblastoide que se encontraban adheridas a la placa, y que lograron alcanzar entre 75 % y 80 % de confluencia, en pocos días. Cuando se obtuvo una población celular homogénea y la cantidad de células requeridas (aproximadamente  $12 \times 10^6$ , pase 3 de proliferación); las células fueron desprendidas enzimáticamente y cultivadas sobre las diferentes composiciones de los hidrogeles de QT: HAP elaborados previamente, siendo estas mezclas 100:0, 90:10, 70:30,50:50 y 30:70 (QT: HAP respectivamente), para posteriormente evaluar el comportamiento de este biomaterial

#### **6.4. Proliferación celular**

La proliferación celular sobre los hidrogeles no solo proporciona una idea del crecimiento de las células sino también da información sobre el proceso de diferenciación; debido a que se ha demostrado en muchos estudios celulares que la proliferación disminuye cuando se inicia la diferenciación; durante esta fase se observa una menor multiplicación, posiblemente porque las células expresan genes asociados al proceso de diferenciación, inhibiendo así los genes relacionados con la proliferación. *In vitro*, la diferenciación osteogénica de las MSC está caracterizada por una etapa inicial de proliferación, seguida de dos etapas, de diferenciación

temprana y maduración, en las cuales la tasa proliferación disminuye. (Brozka y col., 1995; Guilak y col., 2003).

Debido a que en el primer ensayo de medición experimental (resultados no mostrados) se obtuvieron valores de proliferación celular que no arrojan una tendencia clara, esto asociado al hecho de que las desviaciones estándar eran muy altas, no se pudo establecer un análisis comparativo entre los grupos experimentales. Un posible factor causal de estas desviaciones estándar altas es el método de sembrado, en donde las células se resuspendieron previo al conteo, y en este método, el volumen a tomar para colocar el número de células estipulado sobre los andamios fue variable y generalmente muy pequeño, llegando a ser de 10  $\mu$ l. Este resultó ser un volumen muy pequeño, casi despreciable con respecto al volumen total de suspensión (30 - 50 ml), y difícil de manipular para el sembrado de numerosas muestras, conllevando a errores de manipulación, como el pipeteo, al no ser esta una muestra representativa. Es por esto que para la segunda ronda, se decidió resuspender las células a una densidad conocida, a fin de tomar un volumen más representativo para sembrar sobre los andamios (100  $\mu$ L) y mantener una mayor uniformidad. El resto de la discusión se enfocará en el análisis de los resultados obtenidos del segundo ensayo de experimentación.

El proceso de interacción celular con el material es muy dinámico y va a depender de varios factores que van a implicar una respuesta celular; este proceso se puede dividir en diferentes eventos. El primer evento es el contacto de la célula con el medio de cultivo, seguido de la adsorción de las proteínas de superficie al material; posteriormente ocurre la fase de contacto de las células, produciéndose de forma rápida. La fase de adhesión celular se lleva a cabo en períodos más largos e involucra moléculas de adhesión y del citoesqueleto (como filamentos de actina), los cuales van a interactuar para producir una respuesta bien sea en proliferación o diferenciación celular (Fuentes. 2008).

La proliferación de las células cultivadas en los hidrogeles, arrojó resultados interesantes, ya que tanto las células que se expusieron al medio osteogénico como las que no, presentaron una baja eficiencia de sembrado (el número de células adheridas sobre las que se encontraban en suspensión). Esto puede deberse al hecho de que los biopolímeros son generalmente materiales

inertes, con pocos grupos que puedan interactuar con los receptores encargados de la adhesión, como lo son los de tipo integrina (Álvarez-Barreto y col. 2007). En el caso del quitosano, este presenta grupos amino que, por tener una carga positiva, pueden establecer este tipo de interacciones (Ino y col. 2013), pero, debido al proceso de entrecruzamiento, muchos de estos grupos fueron comprometidos en la reacción o quedaron inmersos en la matriz. Por lo tanto, es posible que hayan sido pocos, en comparación con la totalidad de los grupos amino, expuestos en la superficie, y por ende hubo menos puntos energéticamente favorables para la adhesión, a diferencia de la placa de cultivo, en el pozo control, la cual ha sido tratada con plasma para hacerla especialmente “atractiva” para la adhesión celular ([http://www.corning.com/lifesciences/us\\_canada/en/technical\\_resources/surfaces/culture/stc\\_treated\\_polystyrene.aspx](http://www.corning.com/lifesciences/us_canada/en/technical_resources/surfaces/culture/stc_treated_polystyrene.aspx) [consultada 18/09/2013]). Este hecho se demuestra con un mayor número inicial de células en el pozo control en la mayoría de las condiciones de este estudio, encontrándose, en el día 4, valores que representan aproximadamente entre un 50 % y 75 % de las células sembradas, para medio osteogénico y  $\alpha$ -MEM, respectivamente.

En medio  $\alpha$ -MEM, solo en el pozo control se observó el aumento en la proliferación celular sostenido durante los 16 días de cultivo evaluados, un comportamiento típico de las MSC en las cuales no se ha activado la cascada de diferenciación osteogénica. En los hidrogeles, la presencia de HAP, por ser esta un fosfato de calcio el cual es considerado como un material cerámico bioactivo, tiende a estimular la diferenciación hacia el linaje osteogénico, como lo han demostrado en varios estudios en donde la HAP produce la formación de hueso en procesos *in Vivo* (Blardoni y col. 2003; Rivera y col. 2004).

En las células que fueron cultivadas sobre los hidrogeles de QT de MPM en medio osteogénico, con o sin HAP, no se observa proliferación inicial del día 4 al día 10, incluso una disminución en el número de células para algunas condiciones. Esto podría deberse a dos factores; el primero tiene que ver con el acondicionamiento de las células a la nueva superficie de cultivo. Como ya se mencionó, el hidrogel posee características diferentes a las de las placas de cultivo, en el que existen, desde el punto de vista del biopolímero, menos sitios apropiados para la adhesión; además de esto se encuentra la presencia de la hidroxiapatita que confiere rugosidad a la superficie del material, cambiando la topografía sobre la cual las células deben adherirse y proliferar. Otro

posible efecto podría ser que existe un grado de citotoxicidad inicial, el cual es debido a ciertas propiedades intrínsecas de los materiales o del proceso de preparación de los hidrogeles. La citocompatibilidad del quitosano ha sido demostrada en diferentes sistemas, y en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos Humanos del IDEA ya ha sido previamente corroborada la citocompatibilidad del quitosano fotosensible. Pero es posible que la interacción del QT con la HAP modifique las propiedades citocompatibles del sistema.

En otros sistemas de QT-HAP, la presencia de ciertas cantidades de HAP (a partir de un nivel de 50 %), hace que la tasa de proliferación se vea retardada, como es demostrado por Kim y colaboradores en el 2004 y posteriormente por Teng y colaboradores en el 2007. De acuerdo con los autores, este retardo es debido a la rugosidad del material. Este efecto se ve especialmente evidenciado en las mezclas 50:50 y 30:70 en donde, la proliferación se hace significativa al día 16.

La falta de un aumento significativo en el número de células en algunos grupos, tales como 100:0, 90:10 y 70:30, podría también ser indicativo de un proceso de diferenciación avanzado en las etapas tempranas del cultivo. Es posible que el proceso de osteogénesis *in vitro* se haya activado poco después del sembrado sobre los hidrogeles, y por lo tanto las células no tuvieron oportunidad de proliferar suficientemente antes de entrar en la etapa de diferenciación temprana. Este efecto, pudo haber ocurrido de igual manera en las células cultivadas en QT BPM en medio osteogénico, en especial en el pozo control, en el que los efectos del biomaterial se ven descartados.

El medio osteogénico contiene factores que inducen la diferenciación osteogénica; se conoce que estos van a generar cambios en la expresión genética de las células, este tratamiento se basó en un medio basal  $\alpha$ -MEM el cual es bajo en glucosa suplementado con 10 % de SFB, y otros suplementos como la dexametasona,  $\beta$ -glicerol fosfato ( $\beta$ -GP) y ácido ascórbico, en donde cada uno tiene una función específica en el proceso de diferenciación como se mencionó anteriormente de ellos va a inducir la diferenciación de las MSC; ya que la dexametasona, va a estimular la proliferación celular, y a su vez permite la diferenciación hacia el linaje osteogénico (Fuentes, 2008). El  $\beta$ -GP participa en la formación de las sales de calcio, mediante el control de la mineralización, actuando como sustrato de la fosfatasa alcalina (Hamade y col., 2003; Kotobuki y col.2004), y el ácido ascórbico actúa en el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y comienza la

producción de colágeno tipo I, e incrementa la síntesis de proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea (Tuan., 2003; Fuentes, 2008). Los resultados obtenidos en los pozos control también son indicativos de esta hipótesis, puesto que en el medio control negativo de diferenciación ( $\alpha$ -MEM) se observó una proliferación sostenida típica de las MSC no diferenciadas, mientras que en medio osteogénico la proliferación disminuyó e incluso hubo una caída en el número de células, indicativo de la senescencia de osteoblastos en sus últimas etapas de diferenciación (Alvarez-Barreto, 2011).

El aumento de la población celular en los hidrogeles después del día 10, para las concentraciones de los hidrogeles 100:0, 90:10 y 70:30 puede deberse a que la cantidad de células que se lograron adherirse a estos presentaron una adaptación lenta al microambiente, encontrando resultados similares a los presentados por Abarrategui (2008), en donde las células que fueron cultivadas sobre los hidrogeles de quitosano, presentaron un crecimiento más lento que las controles (pozos de cultivo sin hidrogel de QT: HAP).

Sin embargo, se observó un aumento en proliferación celular en el día 16 de cultivo, no superando los valores obtenidos en el medio  $\alpha$ -MEM, debido a que probablemente las células que se adhieren al sustrato los días previos a esta medición, tuvieron un proceso de proliferación por la adaptación al material en donde se encontraban, esto se observó en las mezclas 50:50 y 30:70 y en el hidrogel de QT de MPM, siendo este aumento más pronunciado que en las otras mezclas.

Estos resultados tienen similitud con los obtenidos por Maeng y colaboradores en el 2009, en este trabajo se realizaron microesferas porosas con distintas concentraciones de quitosano utilizando la técnica de electro-spray, y donde obtuvieron que el número de células adherida aumentaba a medida de la concentración de QT desde 0,5% hasta 2%, con respecto al peso.

Otra característica importante que pudo influir en los valores obtenidos de proliferación celular, es debida a los poros formados en los hidrogeles, o a la degradación de los mismos en donde muchas de las células llegaron a penetrar dentro de la matriz, y cuando se intentaron disgregar los geles de forma mecánica con el homogenizador, no se liberó todo el contenido celular. Muchos hidrogeles no se desintegraron completamente, esto se hizo más prominente en todos los hidrogeles con células cultivadas en ellos. La degradación de algunos hidrogeles durante el tiempo

de cultivo que resultó en su fraccionamiento en partículas relativamente pequeñas también pudo haber tenido un efecto significativo en los valores obtenidos, en primer lugar, porque parte de los mismos pudieron haber sido descartados durante los cambios de medio, pero también porque la desintegración pudo haber dado paso a un nuevo ambiente de cultivo. En estos cultivos, las células deben, una vez más, adaptarse al nuevo microambiente generado, y disponer de menor superficie para su crecimiento.

Del análisis de los resultados de proliferación se puede concluir que los efectos más significativos en los bajos números de células obtenidos, así como una baja proliferación en los días tempranos de cultivo (4 a 10 días) pueden ser:

1. Un proceso de acondicionamiento de las células a la superficie, que retarda la proliferación.
2. Una baja eficiencia de adhesión de las células al material, demostrada por los mayores números de células en los pozos control.
3. La degradación del material que dificulta el crecimiento celular y las interacciones célula-material
4. La activación acelerada del proceso de diferenciación, haciendo que las células entren en un estado de diferenciación temprana, marcada por una disminución en la proliferación.

## **6.5. Diferenciación osteogénica**

El proceso de diferenciación osteogénica involucra una serie de etapas, las cuales van a corresponder a estadios intermedios de diferenciación del linaje osteoblástico. En estas etapas, se van a observar cambios tanto a nivel celular como molecular. El compromiso de las MSC hacia un linaje específico involucra la expresión de factores de transcripción, y el proceso de maduración consta de la expresión y activación de genes y proteínas que se encuentran asociadas a ese

fenotipo maduro, tales como la osteopontina, osteocalcina, sialo proteína ósea y el gen Runx2 (Rosen y col. 2000).

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina es un marcador ampliamente utilizado para el estudio de la diferenciación osteogénica, ya que se ha demostrado que se encuentra involucrada en el proceso de mineralización de la matriz ósea, generalmente a través de la hidroxilación de pirofosfatos para proveer fosfatos inorgánicos (Orimo. 2010). Por lo tanto la actividad de ALP ha sido utilizada en múltiples estudios como marcador intermedio de la diferenciación osteogénica (Ogura y col. 2004; Álvarez-Barreto. 2010).

En los cultivos con medio osteogénico (figura 9.A y 9.B) hubo actividad de ALP desde el día 4 en todos los hidrogeles, siendo generalmente el valor máximo de la misma este día, e indicando así un proceso de diferenciación temprana que probablemente comenzó poco después del día de siembra de las células sobre los hidrogeles, ya que en este periodo se presenta la regulación de esta enzima (Aubin, 2001). La disminución de dicha actividad a partir del día 10, podría indicar el comienzo en la etapa de maduración del fenotipo osteogénico. Estos resultados corroboran la hipótesis planteada en el análisis de los resultados de proliferación en donde se establece un período de poca proliferación que podría deberse posiblemente a una diferenciación temprana, la cual es confirmada por los altos valores de actividad de ALP en el día 4 de cultivo.

Las células en medio  $\alpha$ -MEM (figura 9. C) fueron el control negativo de diferenciación osteogénica, pero estas también presentaron una actividad de la ALP, a partir del día 10 del cultivo, aunque de una magnitud menor a las encontradas en medio osteogénico. A pesar de ser más bajos, estos valores indican que existe cierto grado de diferenciación. Esto puede deberse a la presencia de HAP en las matrices; He y colaboradores (2012) evaluaron el efecto de recubrimientos de HAP con colágeno sobre la diferenciación osteogénica de MSC utilizando medio de cultivo alfa-MEM (sin los suplementos osteoinductivos). En el mencionado estudio se determinó una diferenciación madura después de los seis días de cultivo en los recubrimientos de solo HAP, indicando que este componente mineral de la matriz extracelular ósea es capaz de disparar por si solo la cascada de osteodiferenciación. A pesar de esta hipótesis, esto no explica la actividad observada en los andamios de 100:0 solo y, aunque muy baja, en los Pc (solo con células en la placa de cultivo).

La actividad encontrada en estas condiciones puede deberse a que el medio  $\alpha$ -MEM tiene rojo fenol, el cual se ha demostrado que produce un aumento en la actividad fosfatasa alcalina y en la producción de colágeno tipo I (Ernst y col. 1989; Lysdahl y col. 2013). Tanto Ernst y colaboradores (1989) y Lysdahl y colaboradores (2013) obtuvieron que la presencia de rojo fenol en el medio puede inducir la diferenciación tanto osteogénica como condrogénica de MSC; los primeros utilizaron medio  $\alpha$ -MEM y probaron tanto con concentraciones menores, igual a las que trae el medio, y los segundos utilizaron medio DMEM, además de un medio sin colorante como control. En ambos casos, en los cultivos con los medios que contenían el colorante se encontraron aumentos significativos en la actividad enzimática, en comparación al medio sin el colorante, en donde esta fue casi imperceptible con el método empleado. Es importante resaltar también, que se pudo apreciar cierto grado de interferencia de los biomateriales en el método utilizado para la medición de la concentración de para-nitrofenol, punto de partida para el cálculo de la actividad de fosfatasa alcalina. Esto fue evidenciado en la figura 10, y podría contribuir con los valores encontrados en los cultivos con  $\alpha$ -MEM. También esto se puede atribuir a una posible “programación” de las células hacia el linaje osteogénico y que pudiera existir una diferenciación espontánea aunque en muy baja proporción como lo han demostrado otros autores, debido a la plasticidad de las mismas.

El otro marcador bioquímico utilizado para evaluar la diferenciación osteogénica fue la deposición de calcio. Como se explicó anteriormente, las sales de calcio, en forma de fosfatos insolubles, se depositan durante la etapa de maduración del fenotipo osteoblástico. La mineralización se lleva a cabo entre las bandas de colágeno tipo I previamente secretadas por las células durante la etapa de diferenciación temprana, tomando lugar además un descenso en la actividad de ALP (Bruder y Caplan. 2000; Álvarez-Barreto y col. 2011).

Este proceso de mineralización (figura 11) se evidenció en los Pc (con células), en algunas condiciones de hidrogeles tales como 100:0 y 70:30 en QT MPM en medio osteogénico y 70:30 en QT BPM medio osteogénico. La aparición de mineralización a partir del día 4 en los Pc (con células) y en el día 10 en los hidrogeles 70:30 corrobora la hipótesis planteada, basada en los resultados de proliferación y actividad de ALP, de que la etapa de diferenciación temprana haya comenzado poco después del sembrado, explicándose los bajos niveles de actividad ALP en los diferentes días de cultivo y la abrupta aparición de sales de calcio. Este resultado obtenido semeja a lo demostrado

por García y colaboradores (2010), en donde la mineralización de la matriz extracelular se produce después del máximo de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Sin embargo, este fenómeno no se observa para las condiciones de 90:10, 50:50 y 30:70; una posibilidad es que exista una composición óptima para la maduración del fenotipo osteogénico, en este caso 70:30. Los niveles de calcio en el Pc medio alfa-MEM confirman el nivel de diferenciación inducido por el rojo fenol.

Los estudios realizados en sistemas poliméricos con HAP arrojan diferentes resultados en cuanto a las etapas de diferenciación. En algunos sistemas de QT: HAP se observa una diferenciación temprana (representada por un pico de actividad ALP) alrededor del día 14, muy similar a lo encontrado en otros sistemas poliméricos como ácido poli-láctico y ácido poli-glicólico entre otros. Debido a que la formación de la matriz extracelular comienza entre los días diez y veinte, para las MSC (Carretero y col. 2009).

Otros trabajos como el de He y colaboradores (2012) encontraron la aparición de marcadores de maduración (osteopontina y osteocalcina) tan temprano como el día 4 cultivo; esto hace pensar que los resultados del presente estudio podrían encontrarse dentro de las etapas de diferenciación temprana y de maduración. Quizás la medición de proliferación, actividad ALP y calcio antes de los 4 días pueda aportar información relevante de este proceso.

Como se expuso anteriormente la HAP tiene la capacidad por si sola de inducir la cascada de diferenciación osteogénica *in vitro*, hecho que se observa en la mineralización de los hidrogeles en medio alfa-MEM el día 16 (figura 11.C). Sin embargo, el hecho de encontrar sales de calcio en todas las condiciones de hidrogeles en medio alfa-MEM contradice la hipótesis de una composición óptima para la diferenciación. Existen varias explicaciones para este fenómeno; una de ellas está relacionada con un potencial efecto antagónico entre la HAP y los componentes osteoinductivos del medio osteogénico. Sería interesante estudiar las interacciones que existen entre estos componentes y evaluar si intervienen en diferentes tiempos de la osteogénesis *in vitro*.

Otra explicación para las señales de calcio encontradas en medio  $\alpha$ -MEM el día 16 para todos los hidrogeles, a diferencia de lo observado en medio osteogénico. podría estar relacionada con el método utilizado para la cuantificación del calcio depositado. Los hidrogeles originalmente poseen un alto contenido de calcio que sobrepasan el rango detectable del método de la O-

cresolftaleina; por lo tanto hubo que hacer diluciones con altos factores de dilución (1:100 y 1:1000) para poder detectar las diferencias entre los hidrogeles sin células y con células. Este hecho aunado a la degradación observada en muchas de las condiciones podría arrojar errores sustanciales en el cálculo de la cantidad de calcio depositado. La figura 12 muestra la alta variabilidad en consistencia con los valores obtenidos para los hidrogeles de MPM, particularmente en los incubados en medio alfa-MEM, mientras que para QT BPM las mediciones fueron menos dispersas y más similares al valor esperado, esto es una demostración de la degradación de los hidrogeles, que fue más prominente en medio alfa-MEM, y en hidrogeles sin células.

Por lo tanto, debido a que los resultados de deposición de calcio son producto de la substracción de los valores obtenidos para los hidrogeles con células menos los hidrogeles sin células, se puede decir que los resultados de calcio en medio alfa-MEM no son confiables, y no se puede establecer una conclusión clara con esta condición. Sin embargo, comparativamente, los resultados obtenidos para los hidrogeles con QT de BPM, y a concentraciones menores de HAP, en medio osteogénico, son más confiables. Esto es corroborado también en la figura 10 en donde se observa una menor dispersión de los datos de concentración de para-nitrofenol para QT BPM. Sin embargo, la mejor manera de superar estos problemas con mediciones del calcio sería evaluar otros marcadores de diferenciación madura como la osteopontina, osteocalcina y sialo proteína ósea.

Es evidente, a partir de los resultados de proliferación, actividad de ALP y deposición de calcio, que existe una diferenciación osteogénica temprana, pero es claro, de igual manera, que la degradación del material juega un papel preponderante. No obstante, el hecho de que los hidrogeles con células presentaran más dificultad para disgregarse mecánicamente puede ser un indicativo de la segregación de una matriz extracelular por parte de las células, probablemente rica en colágeno tipo I, que pudiese mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles.

## **6.6. Evaluación de la Morfología Celular**

Durante el proceso de osteodiferenciación, las células madre mesenquimales van perdiendo su morfología fibroblastoide para convertirse en osteoblastos de morfología cuboidal, formando

agregados o nódulos y aumentando la expresión de la ALP y la posterior mineralización de la matriz extracelular (Pittenger y col., 1999; Meyer. 2011). Inicialmente en el día 4, las células ya presentaron una morfología diferente a la fibroblástica con tendencia a una morfología cuboidal, indicando un posible proceso de diferenciación temprana y corroborando la hipótesis basada en los resultados de proliferación, ALP y calcio de que el proceso de diferenciación temprana ocurre poco después del sembrado. Esto se puede comprobar con las imágenes mostradas en el apéndice 10.7, en donde se muestran MSC sin diferenciar y osteoblastos; estos últimos con una morfología similar a las células observadas en el día 4.

En la etapa inicial del cultivo las células se ven extendidas sobre las superficies de los hidrogeles con un arreglo claro de los filamentos actina, generalmente en paralelo, hasta formar filopodios, una señal clara de fuertes interacciones célula-biomaterial. En el caso del QT BPM se observan mayor cantidad de filopodios lo que hace inferir interacciones célula-andamio aún mayores que las observadas en QT MPM. Estas fuertes interacciones restan validez a la hipótesis planteada en el análisis de los resultados de proliferación, de que este proceso se retardó debido a un proceso de acondicionamiento de las células a la superficie del material, puesto que estas interacciones son una muestra no solo de que las células ya están acondicionadas sino que posiblemente ya estén cumpliendo sus funciones de proliferación y, potencialmente, diferenciación. Al mismo tiempo la disminución en tamaño en QT BPMP en comparación con QT MPM podría indicar un estado de diferenciación aún más avanzado. Para el día 10 se observa penetración celular en la matriz de QT: HAP quizás como consecuencia de las interacciones iniciales célula-biomaterial. No obstante y en QT BPM ya se observan colonias celulares que podrían indicar puntos de nucleación de las sales de calcio.

La menor densidad observada el día 16 en QT MPM podría ser indicativo de una mayor penetración de la matriz por parte de las células o bien muerte celular de osteoblastos en la superficie, que ya se encuentran en un estado avanzado de maduración. Este efecto se hace aún más pronunciado el día 21 en donde además la degradación de los hidrogeles se dificulta la visualización de las muestras. En el caso de QT BPMP se siguen observando los agregados celulares para las composiciones 70:30 y 50:50, en todos los tiempos de cultivo estudiados; mientras que a mayores concentraciones la degradación se hace una vez más evidente y se observan

agregados celulares con mucha dificultad. Estos resultados de microscopia confocal son un indicativo de que los hidrogeles de QT BPM podrían proveer un microambiente más apropiado para la adhesión y diferenciación celular y por ende para guiar la formación de nuevo tejido óseo.

Los resultados encontrados en el presente trabajo tanto de proliferación como de diferenciación (actividad ALP y deposición de calcio) y microscopia confocal se compaginan para indicar un proceso acelerado de diferenciación osteogénica, en donde no se logró apreciar la etapa inicial de proliferación. A pesar de lo interesante de este fenómeno, que indica un claro potencial osteogénico *in vitro* del sistema QT: HAP propuesto, es indudable que la degradación de los hidrogeles tuvo un efecto significativo sobre el comportamiento celular, mermando dicho potencial en aplicaciones prolongadas. Cuando las células son inicialmente sembradas sobre una superficie, primero ocurre un proceso de adaptación de las mismas después del cual comienza la proliferación; si ocurre una degradación, en este caso evidente por un fraccionamiento de la matriz, las células deben adaptarse nuevamente a las nuevas condiciones que, en realidad, desde el punto de vista topográfico, ellas censarían como otro biomaterial. En este estudio como se observó una rápida degradación de las matrices, es posible que las células no hayan tenido oportunidad de proliferar antes de entrar en la diferenciación puesto que tuvieron que pasar de un sistema de hidrogel a un sistema de cultivo en suspensión.

Esta degradación fue más evidente en presencia de medio de cultivo en comparación con la incubación en PBS en la que los hidrogeles fueron estables por 24 días, indicando que puede haber componentes (minerales u orgánicos) que afecten la integridad de las estructuras poliméricas. La degradación también estuvo posiblemente relacionada a un problema de eficiencia de entrecruzamiento de las cadenas del QT debido a la alta cantidad de HAP que podría ejercer un efecto estérico en el acercamiento de las cadenas, o también a que no se haya llevado a cabo satisfactoriamente el proceso de modificación con la AZ, logrando niveles menores de incorporación de los grupos nitrene en la cadena del QT a los encontrados previamente en la literatura (Ono y col, 1999).

La combinación de la mezcla de QT y HAP que parece tener mayor potencialidad como un andamio para la regeneración de tejido óseo fue la proporción 70:30 con QT BPM, ya que esta

combinación permitió una buena adhesión celular y un proceso de diferenciación marcado, evidenciado por los altos niveles de deposición de calcio a partir del día 10 y la formación de colonias celulares típicas del proceso de diferenciación osteogénica, al mismo tiempo que presentó una de las menores tasas de degradación. Sin embargo, es importante llevar a cabo un estudio más exhaustivo de la modificación del QT y la formación y caracterización de los hidrogeles desde el punto de vista físico y químico a fin de proponer un sistema más eficiente que permita elaborar conclusiones más contundentes.

## 7. CONCLUSIONES

1. El sistema quitosano: hidroxiapatita planteado en el presente trabajo presentó un claro potencial osteogénico a corto plazo, evidenciado por una diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales poco después de su sembrado. Esto es corroborado por una retardada proliferación, acompañada de altos niveles de actividad de ALP en el día 4, y evidenciado por una morfología osteoblástica temprana.
2. La escogencia del disolvente para la preparación de las soluciones de quitosano modificado con LA y AZ resultó ser de vital importancia en la elaboración de los hidrogeles.
3. Se establecieron las mejores condiciones y proporciones de las mezclas quitosano/hidroxiapatita, en cuanto a su estabilidad, para la realización de los hidrogeles, resultando ser las composiciones 100:0, 90:10, 70:30, 50:50 y 30:70.
4. La resistencia mecánica de los hidrogeles se encuentra relacionada con la proporción QT/HAP que se encuentre en ellos, siendo más resistente los hidrogeles 90:10 y 70:30.
5. Los cultivos celulares de las células madre mesenquimales permitieron la obtención de una población homogénea y con gran capacidad de proliferación.
6. Al medir la actividad fosfatasa alcalina, los resultados obtenidos muestran una diferenciación temprana de las células, con resultados más consistentes en las condiciones de quitosano de bajo peso molecular, en donde se encontró una menor dispersión en la concentración de para-nitrofenol.
7. Los resultados obtenidos en la deposición de calcio muestran que los hidrogeles están interviniendo en el proceso de diferenciación de las células, con una aparición de matriz mineralizada en el día 10 para la composición 70:30 en quitosano de bajo peso molecular.
8. Al evaluar la morfología celular se observan células ya diferenciadas con una morfología celular similar a la de los osteoblastos. También se observó penetración celular en la matriz, indicando la capacidad de formación de tejido óseo dentro de la misma. Por esto se puede

concluir que los hidrogeles, en especial 70:30 y 50:50, tienen un potencial osteoinductivo y osteoconductor.

9. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, en general indican que la metodología usada para la elaboración de los hidrogeles quitosano/hidroxiapatita permitió la obtención de sistemas aptos para cultivos de corta duración (hasta 10 días) de las células madre mesenquimales y su diferenciación hacia el linaje osteogénico; sin embargo, debido a la degradación pronunciada después de los 10 días, estos sistemas podrían resultar inadecuados para aplicaciones a largo plazo.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios que permitan determinar el grado de sustitución de los grupos amino del quitosano, en ambas fases de la modificación química realizada, para ello se recomienda el uso de espectrometría de infrarrojo (FTIR). De igual manera se propone variar los niveles de modificación a fin de obtener hidrogeles menos propensos a la desintegración en medio de cultivo.
2. Determinar la interacción que se produce entre el quitosano e hidroxiapatita a través de microscopía electrónica de barrido y otras técnicas físico-químicas.
3. Determinar las características físicas de los hidrogeles quitosano/hidroxiapatita, tales como grado de hinchamiento, así como las propiedades mecánicas de los mismos.
4. Realizar estudios comparativos del potencial de diferenciación osteogénica de células provenientes de médula ósea otros roedores y de humanos, con el objetivo de evaluar posibles modificaciones epigénicas.
5. Realizar ensayos de viabilidad celular, por medio de distintos métodos como el uso de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium deshidrogenasa (MTT).
6. Utilizar una metodología diferente para el estudio de la etapa de maduración de las células diferenciadas basándose en técnicas de biología molecular. En este caso se podrían evaluar otros marcadores como la osteopontina y la osteocalcina.
7. Realizar un estudio más profundo sobre las posibles propiedades de la hidroxiapatita, sobre la inducción de deposición de calcio.
8. Llevar a cabo un estudio preliminar del potencial osteogénico de las matrices *in vivo* utilizando un defecto craneal de tamaño crítico en ratas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarrategui, A. 2008. Estudio del Quitosano como biomaterial Portador de rhBMP-2: Desarrollo, Caracterización y Aplicabilidad en Regeneración de Tejido Óseo. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
2. Acosta, N., Jiménez, C., Borau, V., Heras, A. 1993. Extraction and Characterization of Chitin from Crustaceans. *Biomass Bioenerg.* **5 (2)**: 145-153.
3. Alcocer, A, Sociedad Española de Reumatología. 2009. Manual de Enfermedades Óseas. Editorial Panamericana. Madrid, España. <http://books.google.co.ve/> [consultado 11/09/2013]
4. Álvarez-Barreto, JF., Shere, MC., Deangelis, PL., Sikavitsas, VI. 2007. Preparation of a Functionally Flexible, Three-Dimensional, Biomimetic Poly(L-Lactic Acid) Scaffold with Improved Cell a Adhesion. *Tissue Eng.* **13(6)**: 1205-1217.
5. Álvarez-Barreto, JF. 2009. Regeneración Ósea a Través de la Ingeniería de Tejidos: Una Introducción. *RET.* 1:97-108.
6. Álvarez-Barreto, JF., Landy, B., VanGordon, S., Place, L., DeAngelis, P., Sikavitsas, V. 2010. Enhanced Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Seeded in RGD-Functionalized PLLA Scaffolds and Cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Eng Regen Med.* **10**: 338-350.
7. Alves de Oliveira, B., De Souza, L., Eurides, D., Franco Da Silva, L., Binda, L., Araújo, C. 2011. Aislamiento, Viabilidad y Rendimiento de Células Mononucleares de Médula Ósea de Conejos. *Acta BioquímClinLatinoam.* **45 (1)**: 113-118.
8. Andreu, D., Rivas, L. 1997. Péptidos en Biología y Bioquímica. Volume 27 of Nuevas Tendencias/ Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Editorial CSIC - CSIC Press. Madrid, España. <http://books.google.co.ve/>[consultado 14/06/2013].
9. Arévalo, J. Páez, D. 2007. Cultivo de células madre mesenquimales a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

10. Armstrong M., Spencer, R, Cunningham, R., Gheduzzi, S., Miles, A. Learmonth, D. 2002. Mechanical characteristics of antibiotic-laden bone cement. *Acta Orthop. Scand.* **73**, 688–690.
11. Aubin, J. 2001. Regulation of Osteoblast Formation and Function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2**:81–94.
12. Berghoff, C. 2011. Desarrollo y Caracterización de Matrices Compuestas Quitosano/ Polímero Sintético para Regeneración de Tejido Óseo. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
13. Bello, S., De Jesús-Maldonado, I., Rosim-Fachini, E., Sundaram, P., Diffoot-Carlo, N. 2010. In vitro Evaluation of Human Osteoblast Adhesion to a Thermally Oxidized  $\gamma$ -TiAl Intermetallic Alloy of Composition Ti-48Al-2Cr-2Nb (at. %). *J Mater Sci Mater Med.* **21 (5)**: 1739-1750.
14. Blardoni, F., González, R., Maestre, H. 2003. Aplicaciones de Hidroxiapatita HAP-200 como Sustituto de Injertos Óseos en Ortopedia. *Memorias V Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería*. La Habana, Cuba. <http://www.hab2003.sld.cu/> [consultado 09/09/2013].
15. Bruder, S y Caplan, A. 2000. Bone Regeneration through Cellular Engineering. Principles of Tissue Engineering. Second Edition.
16. Calvo, R., Figueroa, D., Díaz, C., Abisman, A., Figueroa, F. 2011. Aloinjertos Óseos y la Función del Banco de Huesos. *Rev. Med. Chile.* **139**: 660-666.
17. Caplan, A., Jaiswal<sup>1</sup>, N., Haynesworth, S., Bruder, S. 1998. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells *in Vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry.* **64**:295–312
18. Caplan, A. Bruder, S. 2001. Mesenchymal Stem Cells: Building Blocks for Molecular Medicine in the 21 St. Century. *Trends Mol. Med.* **7**: 259-264.
19. Carretero, C., Bernal, C., Torres, M., Jamuna, K., Ayad, F., Mikán, J. 2009. Evaluación de la Biocompatibilidad de Apatita Carbonatada de Síntesis Seca por Medio del Cultivo de Células Osteoprogenitoras de Porcino. *Rev. Fac. Med.* **17 (2)**: 12-18.

20. Coates, EE., Riggin, CN., Fisher, JP. 2013. Photocrosslinked Alginate with Hyaluronic Acid Hydrogels as Vehicles for Mesenchymal Stem Cell Encapsulation and Chondrogenesis. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **101 (7)**: 1962-1970.
21. Czekanska, E., Stoddart, M., Richards, R., Hayes, J. 2012. In Search of an Osteoblast Cell Model for *in Vitro*. Research. *EurCells Mater.* **24**: 1-17.
22. Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., Giannoudis, P. 2011. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Med.* **9**:66.
23. Donovan, P., Gearhart, J. 2001 The End of the Beginning for Pluripotent Stem Cells. *Nature.* **414**: 92-97.
24. Ernst, M., Schmid, C., Froesch, E. 1989. Phenol Red Mimics Biological Actions of Estradiol: Enhancement of Osteoblast Proliferation *in Vivo* and of Type I Collagen Gene Expression in Bone and Uterus of Rats *in Vivo*. *J. steroid. Biochem.* **33 (5)**: 907-914.
25. Errington, N., Harding, S., Varum, K., Illum, L. 1993. Hydrodynamic Characterisation of Chitosans Varying in Molecular Weight and Degree of Acetylation. *Int J Biol Macromol.* **15**: 113-117
26. Estrada, C., Paz, A., López, L. 2006. Ingeniería de Tejido Óseo: Consideraciones Básicas. *Revista EIA.* **5**:93-100.
27. Falke G. y Atala A.2000. Reconstrucción de Tejidos y Órganos Utilizando Ingeniería Tisular. *Arch Argent Pediatr.* **2**:103-105.
28. Fedorovich, NE., Swennen, I., Girones, J., Moroni, L., Van Blitterswijk, CA., Schacht, E. y colaboradores. 2009. Evaluation of Photocrosslinked Lutrol Hydrogel for Tissue Printing Applications. *Biomacromolecules.* **10 (7)**: 1689-1696.
29. Fernández, .I, Alobera M., Del Canto, M., Blanco, L (a). 2006. Physiological Bases of Bone Regeneration I. Histology and Physiology of Bone Tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* **11 (1)**:47-51.

30. Fernández, J.I., Alobera M., Del Canto, M., Blanco, L (b). 2005. Physiological Bases of Bone Regeneration II. The Remodeling Process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. **11 (2)**: 151-157.
31. Flores, I. 2010. Caracterización biológica de las células mesenquimales. Tesis de Especialización. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. México.
32. Fuentes, M. 2008. Optimización del Sistema de Cultivo y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a Partir de la Médula Ósea Humana. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia
33. García, F., Posada, O., Gallego, D., Higueta, N., Sarassa, C., Hansford, D., Agudelo, P. y colaborador. 2008. Isolation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Evaluation of their Osteogenic Potential. *Revista Ingeniería Biomédica*.**2**: 48-55.
34. García, DM., Gomes, M., Reis, RL., Moratal, D., Salmerón-Sánchez, M., Ribelles, JL., Mano, JF., 2010 Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Chitosan Scaffolds with Double Micro and Macroporosity. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **95 (4)**: 1182-1193.
35. García, R., Mendoza, A. 2010. Estudio de las Propiedades Morfológicas y Reológicas de una Red Híbrida de Polímeros Sintetizada a Partir de Tres Biopolímeros: Gelatina/Quitosa/Dextran. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. **11**: 88-109.
36. Hahn S., Jelacic S, Maier, R., Stayton, P., Hoffman, A. 2004. Anti-Inflammatory Drug Delivery from Hyaluronic Acid Hydrogels. *J Biomater Sci Polym*. **15**:1111-1119.
37. Hamade, E., Azzar, G., Radisson, J., Buchet, R., Roux, B. 2003. Chick Embryo Anchored Alkaline Phosphatase and Mineralization Process *In Vitro*. *Eur. J. Biochem*.**270**: 2082-2090.
38. Hao, Y., Xu, P., He, C., Yang, X., Huang, M., Xing, J., Chen, J. 2011. Impact of Carbodiimide Crosslinker Used for Magnetic Carbon Nanotube Mediated GFP Plasmid Delivery. *Nanotechnology*. **22**: 1-9.
39. He, J., Huang, T., Gan, L., Zhou, Z., Jiang, B., Wu, Y., Wu, F y colaboradores. 2012. Collagen – Infiltrated Porous Hydroxyapatite Coating and its Osteogenic Properties: *In vitro* and *in vivo* Study. *J. Biomed Mater Res A*. **100 (7)**: 1706-1715

40. Heikey, T., Nakahata, T. 2004 Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *IntJHematol.* **79**: 7-14
41. Hench, L., Ethridge, E. 1982. Biomaterials. An Interfacial Approach. Biophysics and Bioengineering Series. Vol 4. AcademicPress. NY.
42. Hernández, B., Inostroza, V., Carrión, A., Chaparro, P., Quintero, H., Sanz, R. 2011. Proliferación de Células Madres Mesenquimales Obtenidas de Tejido Gingival Humano Sobre una Matriz de Quitosano: Estudio *in vitro*. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral.* **4**: 59-63.
43. Hernández, H., Almanza, E., Flores, O., Viveros, E., Cassellis, E. 2009. Obtención y Caracterización de Quitosano a Partir de Exoesqueletos de Camarón. *Superficies y vacios.* **22**: 57-60.
44. Herzog, E., Chai, L., Krause, D. 2003. Plasticity of Marrow-Derived Stem Cells. *Blood.***102**: 3483-3492.
45. Hoffman A. 2002. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv Drug Deliv Rev.* **54**:3-12.
46. Hutmacher, D. 2000. Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage. *Biomaterials.***21**: 2529-2543.
47. Infante, P., Gutiérrez, J., Torres, D., García, A., González, J. 2007. Relleno de Cavidades Óseas en Cirugía Maxilofacial con Materiales Autólogos. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac.* **29**:7-19
48. Ino, JM., Chevallier, P., Letoumeur, D., Mantovani, D., Le Visage, C. 2013. Plasma Functionalization of Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel for Cell Adhesion Enhancement. *Biomatter.* **3(4)**.
49. Ishihara, M., Nakanishi, K., Ono, K., Sato, M., Kikuchi, M., Saito, Y., Yura, H y colaboradores. 2002. Photocrosslinkable Chitosan as a Dressing for Wound Occlusion and Accelerator in Healing Process. *Biomaterials.***23**: 833-840.

50. Jaiswal, N., Haynesworth, S., Caplan, A., Bruder, S. 1997. Osteogenic Differentiation of Purified Cultured-Expanded Human Mesenchymal Stem Cell *in vitro*. *J Cell Biochem.* **64**: 295-312.
51. Jameela, S., Lakshmi, S., Nirmala, R., Jayakrishnan, A. 2002. Preparation and Evaluation of Photocrosslinkable Chitosan as Drug Delivery Matriz. *J ApplPolym Sci.* **86**:1873-1877.
52. Jaramillo, P. 2005. Caracterización y Evaluación comparativa del Proceso de Diferenciación Osteogénica de Células Troncales Mesenquimáticas Presentes en la Sangre de Cordón Umbilical y Médula Ósea Humanas. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile
53. Kaigler, D., Mooney, D. 2001. Tissue Engineering's Impact on Dentistry. *J Dental Educ.* **65**: 456-462.
54. Kim, HW, Knowles, J., Kim, HE. 2004. Hydroxyapatite and Gelatin Composite Foams Processed Via Novel Freeze-Drying and Cross-Linking for Use as Temporary Hard Tissue Scaffolds. *J. Biomed. Mate. Res. A.* **72**: 136-145.
55. Kim, Y., Park, Y., Lee, Y., Rhyu, I., Ku, Y. 2012. The Biological Effects of Fibrin-Binding Synthetic Oligipeptides Derived from Fibronectin on Osteoblast-Like Cells. *J Periodontal Implant Sci.* **42**: 113-118.
56. Kolf C., Cho E. and Tuan R. 2007. Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells: Regulation of Niche, Self-Renewal and Differentiation. *Arthritis Research & Therapy.* **9**:204-214.
57. Kon, E., Filardo, G., Roffi, A., Di Martino, A., Hamdan, M., De Pasqual, L., Marcacci, M. y colaborador. 2012. Bone Regeneration with Mesenchymal Stem Cells. *Clin Cases in Mineral and Bone Metabolism.* **9**: 24-27.
58. Kong, C., 2010. Injertos Óseos Aposicionales en los Maxilares. Investigación Bibliográfica del proceso de suficiencia profesional para obtener el título de cirujano dentista. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

59. Kotobuki, N., Hirose, M., Takakura, Y., Ohgushi, H. 2004. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow. *Artificial Organs*. **28**, 33-39
60. Kuci, S., Kuci, Z., Kreyenberg, H., Deak, E., Pütsch, K., Huenecke, S., Amara, C., y colaboradores. 2010. CD271 Antigen Defines a Subset of Multipotent Stromal Cells with Immunosuppressive and Lymphohematopoietic Engraftment-Promoting Properties. *Haematologica*. **95 (4)**: 651-659.
61. Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. 2000. Principles of Tissue Engineering. 2 edición. Academic Press. San Diego-California, Estados Unidos
62. Lind, M., Deleuran, B., Thestrup-Pedersen, K., Soballe, K., Eriksen, EF, Bunger, C. 1995. Chemotaxis of Human Osteoblasts. Effects of Osteotropic Growth Factors. *APMIS*. **103**: 140-146
63. Liu, Y., Wu, G., De Groot, K. 2010. Biomimetic Coatings for Bone Tissue Engineering of Critical – Sized Defects. *J. R. Soc. Interface*. **7**: 631-647.
64. Liuyun, J., Yubao, L., Chengdong, X. 2009. Preparation and Biological Properties of a Novel Composite Scaffold of Nano-Hydroxyapatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose for Bone Tissue Engineering. *J. Biomed Sci*. **16**: 65-75.
65. Lizarbe M. 2007. Sustitutivos de Tejidos: de los Biomateriales a la Ingeniería Tisular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat*. **101**:227-249.
66. Londoño, M., Echevarria, A., De la Calle, F. 2006. Características Cristaloquímicas de la Hidroxiapatita Sintética Tratada a Diferentes Temperaturas. *Revista EIA*. **5**: 109-118.
67. Lysdahl, H., Baatrup, A., Nielsen, A., Foldager, C, Bünger, C .2013. Phenol Red Inhibits Chondrogenic Differentiation and Effects Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem. Cell Rev. and Rep*. **9**: 132-139

68. Maeng, Y., Wook Cho, S. Kim, H. 2009. Culture of human mesenchymal stem cells using electrosprayed porous chitosan microbeads. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **92** 869:893
69. Marques, A., Reis, R., Hunt, J. 2002. The Biocompatibility of Novel Starch Based Polymers and Composites: *in vitro* Studies. *Biomaterials*. **23**: 1471-1478.
70. Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. 2003. Bioquímica. Editorial Pearson Addison-Wiley, Tercera Edición. Madrid, España.
71. Mazzoccoli, JP., Feke, DL., Baskaran, H., Pintauro, PN. 2010. Mechanical and Cell Viability Properties of Crosslinked Low – and High Molecular Weight Poly (Ethylene Glycol) Diacrylate Blends. *Biomed. Mater Res A*. **93 (2)**: 558-566.
72. Meyer, M. 2012. Establecimiento del Cultivo de Células Madre Mesenquimales de la Membrana Amniótica de Fetos de Ratón. Caracterización y Diferenciación *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
73. Mi Zo, S., Singh, D., Kumar, A., Woo Cho, Y., Hwan Oh, T., Soo Han, H. 2012. Chitosan – Hydroxyapatite Macroporous Matrix for Bone Tissue Engineering. *Curr Sci India*. **103 (12)**: 1438 – 1446.
74. Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O., Planell, J. 2008. Biomaterial in Orthopaedics. *J. R. Soc. Interface*. **5**: 1137-1158.
75. Obara, K., Ishihara, M., Ishizuka, T., Fujita, M., Ozeki, Y., Maehara, T., Saito, Y., y colaboradores. 2003. Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel Containing Fibroblast Growth Factor – 2 Stimulates Wound Healing in Healing – Impaired *db/db* Mice. *Biomaterials*. **24**: 3437-3444.
76. Ogura, N., Kawada, M., Chang, WJ., Zhang, Q., Lee, SY., Kondoh, T., Abiko, Y. Kawada. 2004. Differentiation of the Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Enhancement of Cell Attachment by Fibronectin. *Journal of Oral Science*. **46**: 207-213

77. Ono, K., Saito, Y., Yura, H., Ishikawa, K., Kurita, A., Akaike, T., Ishihara, M. 1999. Photocrosslinkable Chitosan as a Biological Adhesive. *J Biomed Mater Res.* **49**:289-295.
78. Orino, H. 2010. The Mecanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J. Nippon Med Sch.* **77 (1)**: 4-12.
79. Ottenbrite, R., Park, K., Okano, T. 2010. Biomedical Applicarions of Hydrogels Handbook. 1<sup>era</sup>edición. Springer New York.
80. Pal, K., Banthia, A., Majumdar, D. 2009. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications – A Mini Review. *Des Monomers Polym.* **12**: 197-220.
81. Parada, L., Katime, I., Crespín, G, Miranda, R. 2004. Caracterización de Quitosano por ViscosimetríaCapilar y Valoración Potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* **5**: 12-19.
82. Parfitt, AM. 1982. The coupling of bone formation to bone resorption: A critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab. Bone. Dis. Relat Res.* **4**: 1-6.
83. Park, S., Park, J., Kim, H., Song, M., Suh, H. 2002. Characterization of Porous Collagen/Hyaluronic Acid Scaffold Modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Cross-Linking. *Biomaterials.* **23**: 1205-1212.
84. Park, H., Choi, B., Hu, J., Lee, M. 2013. Injectable Chitosan Hyaluronic Acid Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **9 (1)**: 4779-4786.
85. Pearce, A., Richards, R., Milz, S., Schneider, E., Pearce, S. 2007. Animal Models for Implant Biomaterial Research in Bone: A Review. *Eur Cell Mater.* **13**:1-10.
86. Peniche, C., Solís, Y., Davidenko, N., García, R. 2010. Chitosan/Hydroxyapatite – Based Composites. *Biotechnología Aplicada.* **27**: 202-210.
87. Peñaranda, A., Londoño, M. 2009. Hidrogeles. Potenciales Biomateriales para la Liberación Controlada de Medicamentos. *Revista de ingeniería biomédica.* **3**:83-97.

88. Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., Moorman, M. y colaboradores. 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. **284**: 143-147.
89. Quintana, J. 1998. Utilización de la Hidroxiapatita en Cirugía Maxilofacial. Actualización Bibliográfica. *Rev. Cubana Estomatol.* **35**: 16-20.
90. Qu, Z., Yan, J., Li, B., Zhuang, J., Huang, Y. 2010. Improving Bone Marrow Stromal Cell Attachment on Chitosan/Hydroxyapatite Scaffolds by an Immobilized RGD peptide. *Biomed Mater.* **5**: 1- 8.
91. Raff, M. 2003. Adult Stem Cell Plasticity: Fact or Artefact?. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**:1-22.
92. Raspell, G. 1997. Cirugía maxilofacial: Patología Quirúrgica de la Cara, Boca, Cabeza y Cuello. 1<sup>era</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. <http://books.google.co.ve/> [consultado 10/01/2013]
93. Rickett, T., Amoozgar, A., Tuchek, C., Park, J., Yeo, Y., Shi, R. 2011. Rapidly Photo-Cross Linkable Chitosan Hydrogel for Peripheral Neurosurgeries. *Biomacromolecules.* **12**: 57-65.
94. Rivera, J., Riaño, C., Echavarría, A., Monsalve, P., Alzate, G., Restrepo, L., Jaramillo, C. 2004. Injertos Óseos – Nueva Alternativa. Fase III. Obtención, Caracterización y Evaluación de Hidroxiapatita Sintética y el Compuesto de Hidroxiapatita Sintética Porosa – Proteínas Morfogenéticas Óseas en un Modelo Experimental Lapino. *Rev. Col. Cienc. Pec.* **17 (1)**: 20-28.
95. Rodríguez, V. 2005. Células madres: Conceptos Generales y Perspectivas de Investigación. *Universitas Scientiarum.* **1**: 5-14.
96. Rosen, E., Spiegelman, B. 2000. Molecular Regulation of Adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16** : 145-17
97. Sándor, G., Lindholm, T., Clokie, E. 2003. Topics in Tissue Engineering. 1<sup>era</sup>edición. University of Oulu.

98. San Julián, M. Valentí, A. 2006. Trasplante Óseo. *An. Sist. Sanit. Navar.* **29 (2)**: 125 – 136.
99. Sinha, V., Singla, A., Wadhawam, R., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S. 2004. Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs. *Int J Pharm.* **274**: 1-33.
100. Sharp, J. 1980. Introducción al Cultivo de Tejidos Animales. Editorial Omega, Segunda Edición. Barcelona, España.
101. Skaugrud, O. 1991. Chitosan – New Biopolymer for Cosmetics and drugs. *Drug Cosmetic Ind.* **148**: 24-29.
102. Solí, Y., García, R., Davidenko, N., Peniche, C., Camerón, R. 2008. Preparación y Caracterización de Composites de Hidroxiapatita Deficiente en Calcio y Quitosana. *Revista CENIC Ciencias Químicas.* **39**: 17-22.
103. Steinhoff, G., 2011. Regenerative Medicine. Editorial Springer, 1<sup>era</sup> Edición, Alemania.
104. Teng, S., Lee, E., Yoon, B., Shin, D., Kim, H., Oh, J. 2007. Chitosan/Nanohydroxyapatite Composite Membranes Via Dynamic Filtration for Guided Regeneration. *J Biomed Mater Res.* **88**: 569-580.
105. Tuan, R., Boland, G., Tuli, R. 2003. Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Based Tissue Engineering. *Arthritis Res Ther.* **5**:32-45.
106. Usha, R., Sreeram, K., Rajaram, A. 2012. Stabilization of collagen with EDC/NHS in the presence of L-lysine: a comprehensive study. *Colloid Surface B.* **90**: 83-90.
107. Venkatesam, J., Kim, S. 2010. Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering- An Overview. *Mar Drugs.* **8**: 2252-2266.
108. Venugopal, J., Prabhakaran, M., Zhang, Y., Low, S., Choon, A., Ramakrishna, S. 2010. Biomimetic Hydroxyapatite-Containing Composite Nanofibrous Substrates for Bone Tissue Engineering. *Phil. Trans. R. Soc. A.* **368**: 2065-2081.
109. Verfaillie, C., Pera, M., Lansdorp, P. 2002. Stem Cells: Hype and Reality. *Hematology.* **1**: 369-391

110. Wagers A., Eissman, I. 2004. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*. **116**:639-48.
111. Watt F., Hogan L. 2000. Out of the End: Stem cell and Their Niches. *Science*. **287**:1427.
112. Weissman, I., Anderso, D., Gag, F. 2001. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Dev. Biol.* **17**:387-403.
113. Williams D. 1999. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool, UK. University Press.
114. Winslow, T. 2001. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions.
115. Wishart, C. 1974. Maxillofacial Injuries. *Brit Med J.* **3**: 513-516.
116. Yubao, Z., Aiping, Y., Xuelin, P., Xuejiang, W., Xiang, Z. 2005. Preparation and *in vitro* Investigation of Chitosan/Nano-Hydroxyapatite Composite Used as Bone Substitute Materials. *J Mater Sci.* **16**: 213-219.
117. Zhang, J., Li, C., Xue, Z., Cheng, H., Huang, F., Zhuo, R., Zhang, X. 2011. Fabrication of Lactobionic-Loaded Chitosan Microcapsules as Potential Drug Carriers Targeting the Liver. *Acta Biomaterialia.* **7**: 1665-1673.
118. Zujur, D. 2013. Evaluación de Recubrimientos Biomimeticos Óseos a Base de Quitosano Fotosensible sobre Ti6Al4V. Trabajo de Grado. Universidad Simón Bolívar. Baruta – Estado Miranda, Venezuela

- Consultas en línea.

1. <http://www.piercenet.com> [Consultado 10/09/2013].
2. [http://www.corning.com/lifesciences/us\\_canada/en/technical\\_resources/surfaces/culture/stc\\_treated\\_polystyrene.aspx](http://www.corning.com/lifesciences/us_canada/en/technical_resources/surfaces/culture/stc_treated_polystyrene.aspx) [Consultado 18/09/2013].

## 10. APENDICES

### 10.1. Medios y soluciones preparadas en el laboratorio para el cultivo celular

#### 10.1.1. Medio Nutritivo Alfa-MEM ( $\alpha$ -MEM) (Cantidades necesarias para preparar 1000 ml)

Sobre de MinimumEssential Medium Alpha Medium (GIBCO)	1 (Cantidad)
Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	3,7 g
Antibiótico y Antimicótico Anti-Anti (antibiotic- antimycotic 100X) (GIBCO)	10 ml
Suero fetal bovino (SFB)	100 ml
Agua bidestiladadesionizada	1000 ml

#### 10.1.2. Solución Buffer de Fosfato (PBS). Cantidades necesarias para preparar 1000 ml)

Cloruro de calcio ( $\text{NaCl}$ )	8 g
Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )	0,20 g
Fosfato de sodio monobásico Heptahidratado( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$ )	2,68 g
Fosfato ácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,27 g
Agua bidestiladadesionizada	1000 ml

### 10.1.3. Dexametasona ( $1 \cdot 10^{-8}$ )

Se realizaron diluciones, a partir de un stock que se preparó

Stock  $1 \cdot 10^{-3}$ , para 10 ml

Dexametasona	3,9 mg
Etanol	10 ml

Stock  $1 \cdot 10^{-5}$ , para 10 ml

Stock de dexametasona $1 \cdot 10^{-3}$	100 $\mu$ l
Etanol	9,9 ml

Stock  $1 \cdot 10^{-8}$ , para 10 ml

Stock de dexametasona $1 \cdot 10^{-5}$	10 $\mu$ l
Etanol	9,99 ml

### 10.1.4. Medio Osteogénico (Cantidades necesarias para 1000 ml)

Medio Alfa-MEM (suplementado con SFB 10%)	1000 ml
Dexametasona ( $1 \cdot 10^{-8}$ )	1 ml
$\beta$ -Glicerolfosfato	2,16 g
Ácido Ascórbico	8,81 g

## 10.2. Soluciones utilizadas para preparar los andamios

### 10.2.1. Ácido Clorhídrico (HCl) (2M), cantidades necesarias para preparar 40 ml

Ácido clorhídrico 37 % v/v (HCl)	2,16 ml
Agua destilada	37,8 ml

### 10.2.2. Solución de quitosano (QT) 1,5 % p/v, cantidades necesarias para preparar 400 ml

Quitosano en polvo ( $4,277 \times 10^5$ g/mol, grado de desacetilación 80%)	6 g
Ácido clorhídrico (HCl) (2M)	40 ml
Agua destilada	360 ml

## 10.3. Soluciones de laboratorio para llevar a cabo, los ensayos para determinar la diferenciación osteogénica

### 10.3.1. Ácido Acético (1N), cantidades necesarias para preparar 200 ml

Ácido acético (60,05 M)	3,33 ml
Agua destilada	196,67 ml

#### 10.4. Soluciones para el marcado celular

##### 10.4.1. Solución de Albumina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS, cantidad necesaria para preparar 10 ml

Albumina sérica bovina (BSA)	1 mg
PBS	10 ml

##### 10.4.2. Triton X-100 al 0,1%, cantidades necesarias para preparar 50 ml

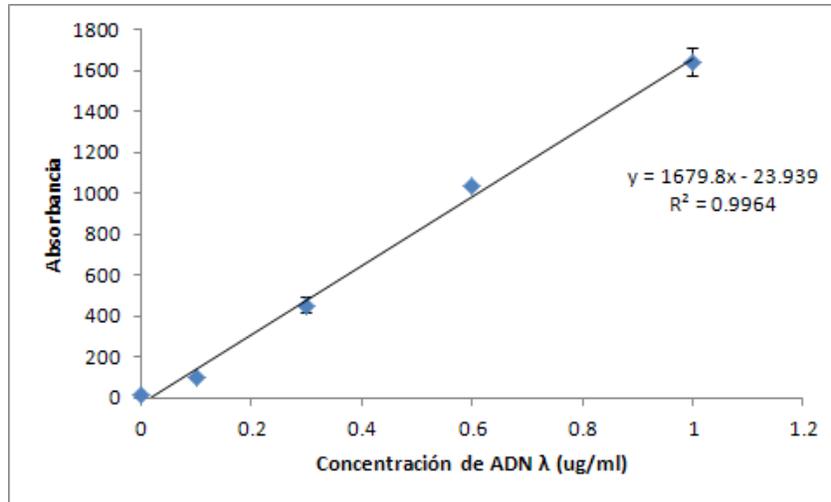
Triton X-100	50 $\mu$ l
PBS	45 ml

##### 10.4.3. Falotoxina Fluorescente (BODIPY FL), cantidad necesarias para 600 $\mu$ l

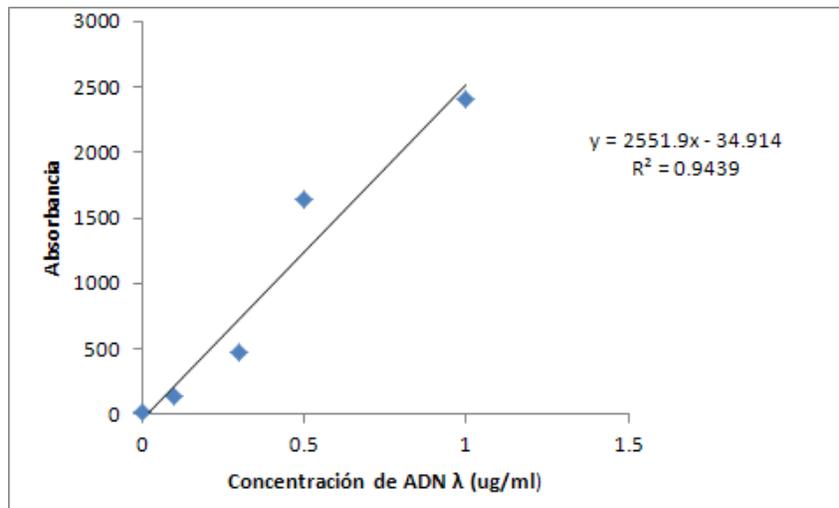
Stock falotoxina fluorescente (BODIPY FL)	15 $\mu$ l
Solución de BSA al 1 %	600 $\mu$ l

## 10.5. Curvas patrón de los ensayos realizados

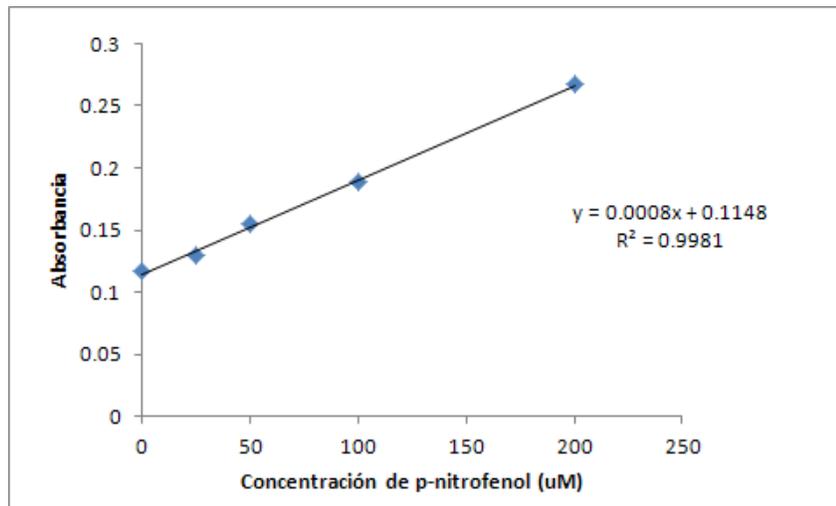
### 10.5.1. Curvas patrón para la cuantificación de la cantidad de ADN en los andamios. Ensayo de proliferación. Primer ensayo



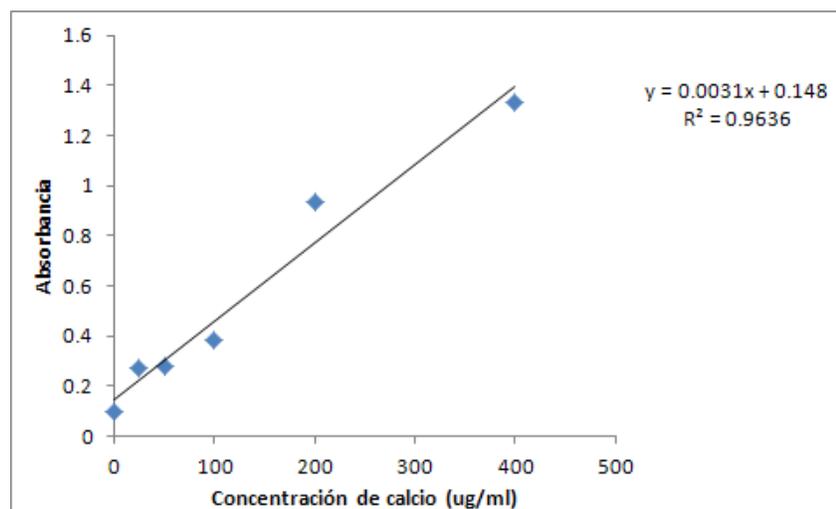
### 10.5.2. Curvas patrón para la cuantificación de la cantidad de ADN en los andamios. Ensayo de proliferación. Segundo ensayo



10.5.3. Curvas patrón para la determinación de la actividad de la enzima ALP. Diferenciación osteogénica



10.5.4. Curvas patrón para la determinación de la deposición de Calcio. Diferenciación osteogénica.



## 10.6. Formulaciones para cálculos realizados para los distintos ensayos

### 10.6.1. Ensayos de proliferación de ADN

$$\text{Cantidad total de ADN} = \left( \frac{\text{Abs} \pm B}{M} \right) \times \text{volumen del pozo}$$

$$\text{Número de células} = \frac{\text{Cantidad total de ADN}}{\text{Cantidad de ADN contenido por célula (3pg)}}$$

### 10.6.2. Determinación de la Actividad Fosfatasa Alcalina

$$[p - \text{nitrofenol}] = \left( \frac{\text{Abs} \pm B}{M} \right) \times \text{volumen del pozo}$$

$$\text{Actividad de ALP} = \frac{[p - \text{nitrofenol}]}{(\text{número de células} \times 0.5h)}$$

### 10.6.3. Determinación de la deposición de calcio

$$\text{Cantidad de calcio} = \left( \frac{\text{Abs} \pm B}{M} \right) \times \text{volumen del pozo}$$

#### 10.6.4. Determinación de cantidad de calcio presente en los hidrogeles QT: HAP.

Ejemplo para la composición 30:70 QT: HAP respectivamente

$$\frac{368 \text{ mg HAP}}{7,9 \text{ ml de QT modificado}} = 46,6 \text{ mg/ml}$$

$$M \text{ HAP}_{30:70} = 46,6 \text{ mg/ml} \times 0,15 \text{ ml} = 7 \text{ mg}$$

#### 10.7. Imágenes de MSC sin diferenciar y de células osteoblásticas

##### 10.7.1. Células Madre Mesenquimales sin diferenciar

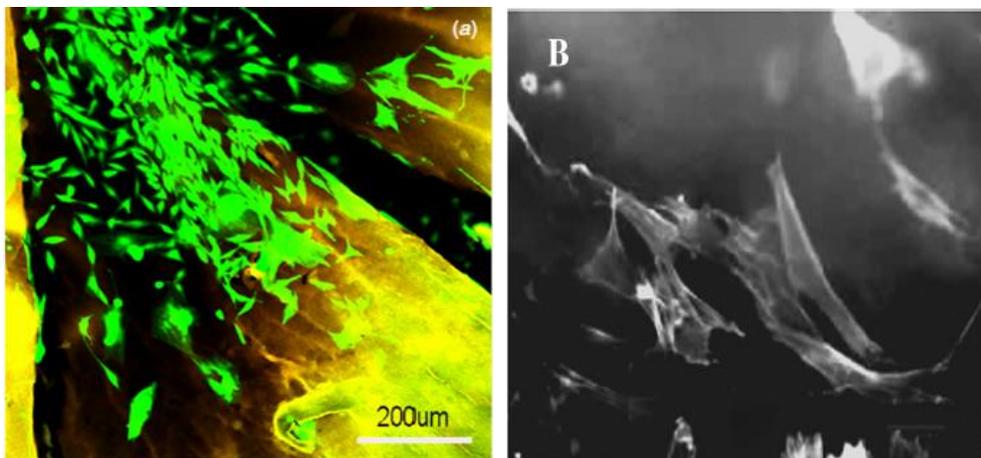


Figura a. MSC sobre andamio de QT: HAP, día 1 de cultivo. Tomado de Qu y colaboradores (2010)

Figura B. MSC sin diferenciar. Tomado de Álvarez-Barreto y colaboradores (2007)

### 10.7.2 Células Osteoblásticas maduros en cultivo

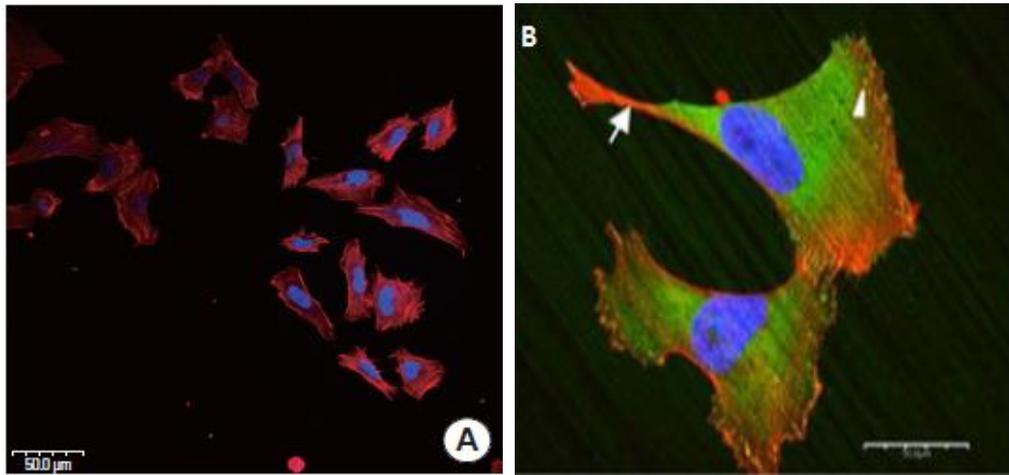


Figura A. Células osteoblásticas de humano. Tomado de Kim y colaboradores (2012)  
Figura B. Células osteoblásticas humanas. Tomado de Bello y colaboradores (2010)