



Universidad Autónoma de Baja California
Ingeniería en Nanotecnología
Facultad de Ingeniería Arquitectura y Diseño

Diseño de andamio tridimensional colágeno/quitosano/nanopartícula para
regeneración ósea

TESIS

Que para optar por el grado de:
Ingeniero en nanotecnología

Presenta:

Arturo Zahid Aguilar Amador

Director de tesis:

Dra. Ana Guadalupe Hernández Rodríguez

Co Director de Tesis:

M.I. Guillermo Amaya Parra

Comité tutor:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**“Diseño de andamio tridimensional
colágeno/quitosano/nanopartícula para regeneración tisular
ósea”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Arturo Zahid Aguilar Amador

Aprobada por:



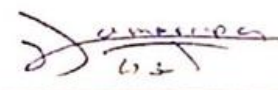
Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández
Director



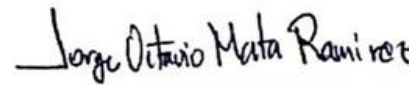
M.I. Guillermo Amaya Parra
Codirector



Dr. Ulises Jesús Tamayo Perez
Sinodal



Dr. José de Jesús Zamarripa Topete
Sinodal



Dr. Jorge Octavio Mata Ramírez
Sinodal

DEDICATORIA

A mi Mamá, que a cualquier día y noche que estaba trabajando en el laboratorio o desde mi computadora, siempre se preocupó por apoyarme en cualquier cosa que pudiera necesitar, mis desvelos son, fueron y siempre serán sus desvelos, a quien le debo el guiarme durante toda la vida y de quien siempre necesitare un consejo y su mano para cualquier reto que la vida y el destino ponga en nuestro camino. Mamá, todo es por ti.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre, a mis familiares, amigos y profesores de la universidad que me aportaron el conocimiento e hicieron posible que este proyecto se llevara a cabo.

Les estaré eternamente agradecido a la Dra. Katrin Quester e Itandehui Betanzo quienes son el responsable técnico académico y administrativo respectivamente en el departamento de Bionanotecnología de CNYN y siempre que necesite asesoría en equipo, material y planeación estuvieron en la mejor disposición de ayudarme.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt responsable del departamento y grupo de Bionanotecnología, quien con su aprobación y apoyo pudo ser posible el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA A MIS TUTORES

Quiero agradecer enormemente a mis tutores: El M.I. Guillermo Amaya por siempre estar al pendiente y dando seguimiento a cualquier actividad realizada para brindarme su apoyo; primeramente, mi profesor, tutor y un colega a quien estimo, respeto y aprecio profundamente.

A mi tutora la Dra. Ana G. Rodríguez por siempre estar al pendiente de mi trabajo dentro y fuera del laboratorio; sus enseñanzas son algo que en verdad me acompañarán toda la vida y las cuales sé que me harán sobresalir en mi futuro académico y laboral, siempre le estaré agradecido por tanta paciencia y dedicación a este trabajo, a este amor al arte.

Tabla de contenido

Índice Figuras y Tablas.....	7
Índice Tablas.	8
1. Introducción	9
1.1. Tejido óseo	9
1.2. Propiedades biomecánicas del hueso	10
1.3. Componentes del tejido óseo	11
1.3.1. Células	11
1.4. Mineralización del hueso por cristalización de hidroxiapatita Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂.....	13
1.4.1. Etapas de nucleación:.....	14
1.5. Estructura microscópica del tejido óseo.....	14
1.6. Daños y afecciones al tejido	16
1.6.1. Fracturas	16
1.6.2. Cáncer óseo.....	16
1.7. Cultivo celular	18
1.7.1. Adhesión celular:	19
1.7.2. Ventajas del cultivo celular:	20
2. Antecedentes	23
2.1. Tratamientos actuales para afecciones del hueso	23
2.1.1. Fracturas	23
2.1.2. Tumores óseos	24
2.1.3. Materiales como sustitutos óseos	25
3. Planteamiento del problema	27
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos	28
5.1. Objetivo general:	28
5.2. Objetivos específicos:	28
6. Materiales y reactivos	29
7. Metodología	30
7.1. Obtención de la matriz de colágeno	30
7.2. Estabilización dimensional del andamio de colágeno.....	32
7.3. Incorporación de nanopartículas de TiO₂ al andamio.....	32

7.4.	Ensayos in vitro.....	33
7.4.1.	Viabilidad celular.....	34
7.4.2.	Fagocitosis (Reacción de Griess).....	36
7.4.3.	Ensayo de Inmunogenicidad	37
8.	Resultados	38
8.1.	Obtención del andamio	38
8.2.	Caracterización de los andamios.	39
8.3.	Cultivo Celular.	42
9.	Discusión.....	45
10.	Conclusiones	50
11.	Referencias	51

Índice Figuras y Tablas.

Figura 1. Representación esquemática de los componentes del tejido óseo. (Tomado de Atlas de histología vegetal y animal; Facultad de biología, Universidad de Vigo, España)..9	9
Figura 2. Grafica de carga vs desplazamiento del comportamiento biomecánico que se encuentra en los subtipos tisulares mencionados con anterioridad. Tomado de biomecánica y hueso Caeiro J. et al [3].10	10
Figura 3. Representación esquemática del proceso de cristalización en el tejido óseo, comenzando con un template de colágeno (triple hélice) donde posteriormente se incorporan las células madre de la medula ósea, convirtiéndose así en células formadoras de hueso: osteoblasto. (Taton, Nature-2001).15	15
Figura 4. Imagen (a) de la sección de fémur utilizado para obtener los pequeños segmentos de 3x3 cm. En la imagen (b) se aprecia el segmento transversal de la diáfisis del tejido.30	30
Figura 5. Se muestra procedimiento de deshidratación con diferentes concentraciones de etanol [desde 50%(v/v) hasta 100% (v/v)]......31	31
Figura 6. Representación esquemática del procedimiento utilizado con AlamarBlue. (Obtenida del sitio web de Bio-rad instruments.35	35
Figura 7. En la imagen (a) se muestra la estructura de colágeno tipo I después de la desmineralización por medios ácidos. En la imagen (b) se muestra la compresibilidad de la estructura obtenida, demostrando así el modo en que se mantiene la estructura de hueso esponjoso una vez desmineralizado el andamio. Fotografía tomada con una amplificación 2X.39	39
Figura 8. Imágenes obtenidas mediante SEM. La imagen (b) es obtenida del andamio Col_Q) y la imagen (a) muestra el andamio de Col.40	40
Figura 9. La figura 4 está compuesta de imágenes del andamio Col_Q_TiO ₂ . En las imágenes a y c se observa cómo se mantiene la estructura trabecular a escala microscópica. En las imágenes b y d podemos observar como las fibras colágenas están saturadas por aglomeraciones de nanopartículas de TiO ₂ , lo cual se aprecia detalladamente a lo largo de la fibra en la imagen d. Esto último se demostró con el análisis de EDS.41	41
Figura 10. Análisis mediante EDS el cual nos muestra los picos característicos para Ti, O y Au a diferentes energías, (KeV) muestra los elementos existentes en el andamio analizado.42	42
Figura 11. Grafica de viabilidad celular. Indica la absorbancia dependiendo la composición de cada muestra, se observa una viabilidad adecuada para todas las mediciones con andamio en comparación con el control positivo (C+).43	43
Figura 12. Representación gráfica de la concentración de nitritos medidos en la reacción de Griess.43	43

Figura 13. Obtención de absorbancias mediante el reactivo QUANTI-Blue™ en el ensayo de inmunogenicidad por activación de receptores tipo Toll de células Raw Blue con 75 ng de LPS. Se muestran las medidas correspondientes a los diferentes tipos de andamio analizados en este estudio, comparados con la muestra del cultivo celular sin algún agente externo (CEL).44

Figura 14. En las imágenes c y d se muestra el andamio sintetizado con ABS con una ampliación 4x. En las imágenes e y f se muestra el andamio sintetizado con PLA.....49

Índice Tablas.

Tabla 1. Tabla de valores de la Resistencia máxima y módulo elástico del hueso cortical de humano en diferentes tipos de ensayos respecto a su resistencia mecánica. Tomado de Biomecánica y hueso, Caeiro J. et al [3].11

Tabla 2. Se muestran las diferentes composiciones de andamio, la zona palomeada en cada celda oscura indica los componentes de cada muestra.33

1. Introducción

1.1. Tejido óseo

Los huesos forman la estructura que sostiene el cuerpo. La mayoría de los huesos son huecos. La parte externa de los huesos consiste en una red de tejido fibroso que se conoce como matriz la cual equivale aproximadamente a un tercio del peso óseo y principalmente se compone de proteínas en de las cuales alrededor del 90% es de colágeno. En la matriz orgánica se depositan sales de fosfato de calcio (la fase mineral del hueso) y constituye una reserva de proteínas las cuales son responsables en la regulación de la diferenciación celular, así como en la integridad y las funciones que realiza el tejido óseo [1].

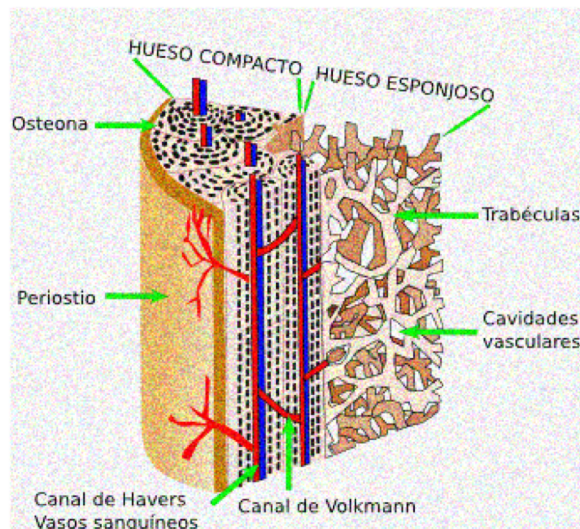


Figura 1. Representación esquemática de los componentes del tejido óseo Tomada de[2].

La capa externa está compuesta de hueso compacto (cortical), la cual cubre el hueso interior esponjoso de menor densidad. Una capa de tejido fibroso que se conoce como periostio recubre la parte externa de los huesos. Algunos huesos son huecos y contienen un espacio que se le llama cavidad medular que contiene el tejido blando llamado medula ósea. Al tejido que reviste la cavidad medular se le llama endostio. En cada extremo de los huesos, hay una zona formada por un tipo de tejido más blando, similar al hueso y denominado cartílago [1].

En la figura 1 se observa una diferenciación del tejido óseo, representando los dos tipos principales de hueso y los componentes del mismo.

1.2. Propiedades biomecánicas del hueso

En función de la estructura del hueso y como se mantiene biomecánicamente se deducen dos subtipos tisulares ya mencionados anteriormente, el hueso cortical y el hueso trabecular o esponjoso. Las diferencias que hay entre estos dos es lo que le confiere importantes implicaciones biomecánicas ya que el hueso cortical posee un módulo elástico mayor y por lo tanto, como se observa en la figura 2, su deformación con respecto al esfuerzo aplicado es mucho menor que en el hueso trabecular, ya que este último posee un módulo de Young menor, (parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico) [3], según la dirección en la que se le aplica una fuerza cuyos valores para el tejido óseo están representados en la Tabla 1 y biomecánicamente describe una curva más aplanada, por lo que podemos interpretar que la carga soportable por unidad de superficie es considerablemente menor pero con un índice de deformación mayor, lo que le confiere mayor flexibilidad [3].

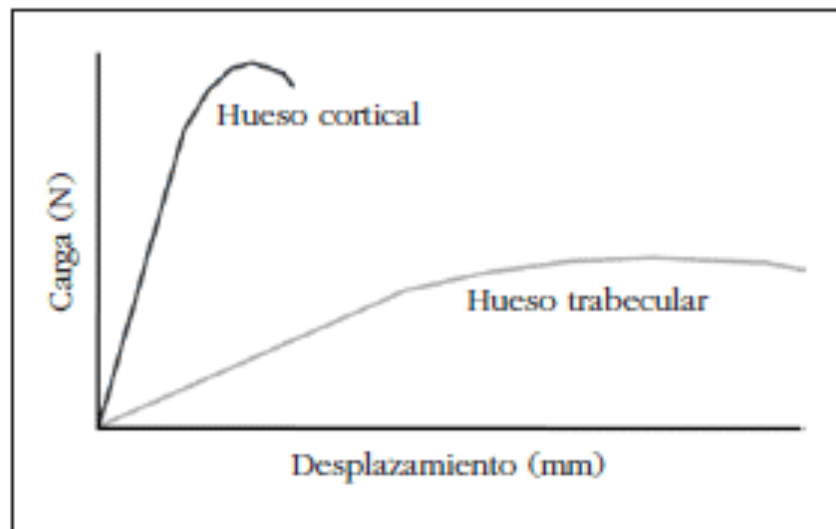


Figura 2. Grafica de carga vs desplazamiento del comportamiento biomecánico que se encuentra en los subtipos tisulares mencionados con anterioridad. Tomado de [3].

Ensayos de compresión	Resistencia	167 – 213 MPa
	Módulo de Young	14,7 – 34,3 GPa
Ensayos de tracción	Resistencia	107 – 170 MPa
	Módulo de Young	11,4 – 29,2 GPa
Ensayos de flexión	Resistencia	103 – 238 MPa
	Módulo de Young	9,8 – 15,7 GPa
Ensayos de torsión	Resistencia	65 – 71 MPa
	Módulo de Young	3,1 – 3,7 GPa

Tabla 1. Tabla de valores de la Resistencia máxima y módulo elástico del hueso cortical de humano en diferentes tipos de ensayos respecto a su resistencia mecánica. Tomado de [3].

1.3. Componentes del tejido óseo

1.3.1. Células

Osteogénicas: Se les conoce también con el nombre de osteoprogenitoras debido a que derivan de otro tipo de células: células mesenquimatosas; estas últimas se diferencian en una u otra célula dependiendo de la cantidad de oxígeno disponible en el microambiente que las rodea [4].

Osteoblastos: Se caracterizan por tener una forma ligeramente cilíndrica y un citoplasma con altos contenidos de retículo endoplásmico rugoso (RER). En el tejido óseo, se encuentran en la superficie externa de los huesos en formación. La importancia de los osteoblastos radica en que son los responsables de sintetizar al osteoide, el cual es una sustancia orgánica segregada dentro de la célula y que se compone de matriz amorfa (se le conoce como matriz amorfa a la unión de GAGs, osteopontina, osteonectina y osteocalcina) y fibras colágenas tipo I, el osteoblasto también se encarga de depositar en el osteoide la matriz inorgánica que consta de cristales de fosfatos y carbonato cálcico [4].

Las fibras colágenas que contiene el osteoide, están unidas unas con otras mediante matriz amorfa y glicoproteínas que, en conjunto, tienen propiedades

cementantes y forman laminas trabeculares. Es en dicho conjunto en donde se depositan las sales de calcio como cristales de hidroxapatita [4].

Osteocitos: Son osteoblastos que se encuentran en las lagunas óseas, las cuales son cavidades dentro de la matriz ósea calcificada. Los osteocitos se mantienen juntos unos con otros a lo largo de la matriz ósea a través de los canalículos óseos [4].

Osteoclastos: Generalmente son células grandes, las cuales se ha reportado que pueden poseer hasta 50 núcleos y que además tienen un citoplasma ligeramente ácido. Los osteoclastos se encuentran en la superficie interna de los huesos densos o de las trabéculas óseas[4].

Las funciones principales de los osteoclastos son el reabsorber el tejido óseo para moldearlo o para extraer calcio cuando es requerido por el organismo. Estas sales de calcio son indispensables para diversas funciones entre las que podemos mencionar la contracción muscular de tejido voluntario o el corazón y en procesos como la coagulación [4].

De manera general, podemos decir que el hueso constituido por dos componentes principales:

- a. Matriz ósea: Es la unión de una parte orgánica y una parte inorgánica.
- b. Matriz orgánica: Está formada por matriz amorfa y matriz fibrilar.

Matriz amorfa: Se conforma por glucosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas y algunos agentes de adhesión tales como lo son la osteocalcina, osteopontina y osteonectina. Esta última actúa como adherente entre las fibras colágenas y los cristales de hidroxapatita, la osteocalcina es precursora del depósito de sales de calcio en las fibras colágena, de ahí proviene su nombre y por último la osteopontina relaciona las células del tejido óseo a la matriz ósea; la síntesis de estas últimas proteínas está estimulada por la vitamina D [4].

Matriz fibrilar: Está constituida por fibras colágenas tipo I, por eso es matriz fibrilar. Contiene a la enzima fosfatasa alcalina, la cual se encarga de extraer las sales cálcicas de los vasos sanguíneos vecinos a los centros de osificación y calcificación, depositándolas en las estriaciones de las fibras colágenas [4].

1.4. Mineralización del hueso por cristalización de hidroxiapatita



La formación de los cristales de hidroxiapatita es de los primeros pasos en la formación del tejido óseo, ocurre después de tener una matriz polimérica orgánica como es el caso de las fibras de Colágeno [5], las cuales se utilizan como template para la nucleación de los cristales [6]; con base en esto, llega el interés de generar un andamio orgánico formado principalmente de fibras de colágeno el cual pueda fungir como reemplazo del tejido dañado y sobre este andamio se pueda comenzar la regeneración de tejido nuevo.

El colágeno es uno de los materiales frecuentemente utilizados en el campo de la medicina y la ingeniería de tejidos, ya sea para tratar daños o afecciones químico-mecánicas en diferentes zonas del organismo, debido a su gran biocompatibilidad y capacidad para reducir los tiempos en el proceso de cicatrización de una herida. El colágeno es una proteína estructural y constituye aproximadamente una tercera parte de las proteínas presentes en el organismo de un mamífero; principalmente funciona como proteína estructural y de soporte (con anterioridad se mencionó su función en la síntesis de nuevo tejido) ya que es un componente vital de la matriz extracelular. Existen aproximadamente 16 tipos de colágeno presentes en el humano, siendo el colágeno tipo I, II y III los más abundantes. El colágeno tipo I se encuentra principalmente en el hueso, por eso la importancia de obtener el template de este tipo de proteína. Tanto el I, II o III tienen la misma configuración espacial, la cual consta de una triple hélice en su estructura molecular y a su vez, cada una de estas hélices está formada por el enrollamiento de 3 cadenas unidas entre sí. Recordemos que una de las funciones principales de el colágeno tipo I (o bien de las fibras colágeno tipo I) es brindar estructura y soporte al tejido, esta resistencia

se obtiene debido a las uniones intra y extramoleculares que presentan las cadenas unidas entre sí, dando origen a la estructura tridimensional del colágeno [7].

1.4.1. Etapa de nucleación:

Es el proceso por el cual el cristal estable se comienza a formar a partir de una fase líquida homogénea. Es aquí donde queda definido el número de cristales ya que en la etapa de crecimiento el material en solución se va depositando sobre los núcleos ya formados, y dependiendo del grado de sobresaturación (en el caso de sales inorgánicas, cuando la solubilidad del soluto aumenta considerablemente en función de la temperatura), mayor saturación equivale a menor tamaño de los cristales debido a que hay un espaciamiento sumamente pequeño entre ellos, lo que les impide crecer desbordantemente [6].

1.5. Estructura microscópica del tejido óseo

a) Hueso esponjoso o trabecular:

Esta parte del hueso está constituido segmentos llamados trabéculas, estas trabéculas son las responsables de la estructura tridimensional del hueso, debido a las laminillas óseas que las forman [4][8].

La estructura trabecular está canalizada paralelamente a los indicios de presión o a la fuerza que se aplica en articulaciones. Si recordamos los segmentos del hueso: epífisis, diáfisis y metáfisis, podemos relacionar la presencia de este tipo de hueso (esponjoso) con la resistencia mecánica, debido a la estructura trabecular que contiene poco material y peso ligero, pero gracias a ese arreglo dimensional le confiere una gran resistencia a esfuerzos en dicha zona [4].

Entre estas estructuras trabeculares se encuentra la medula ósea, tanto la medula ósea hematopoyética (también conocida como roja) y la amarilla, esta última se encuentra conformada por células almacenadoras de lípidos.

La estructura trabecular tiene acoplado una gran cantidad de vasos sanguíneos los cuales son responsables de aportar los nutrientes necesarios a las células presentes en la medula ósea [4].

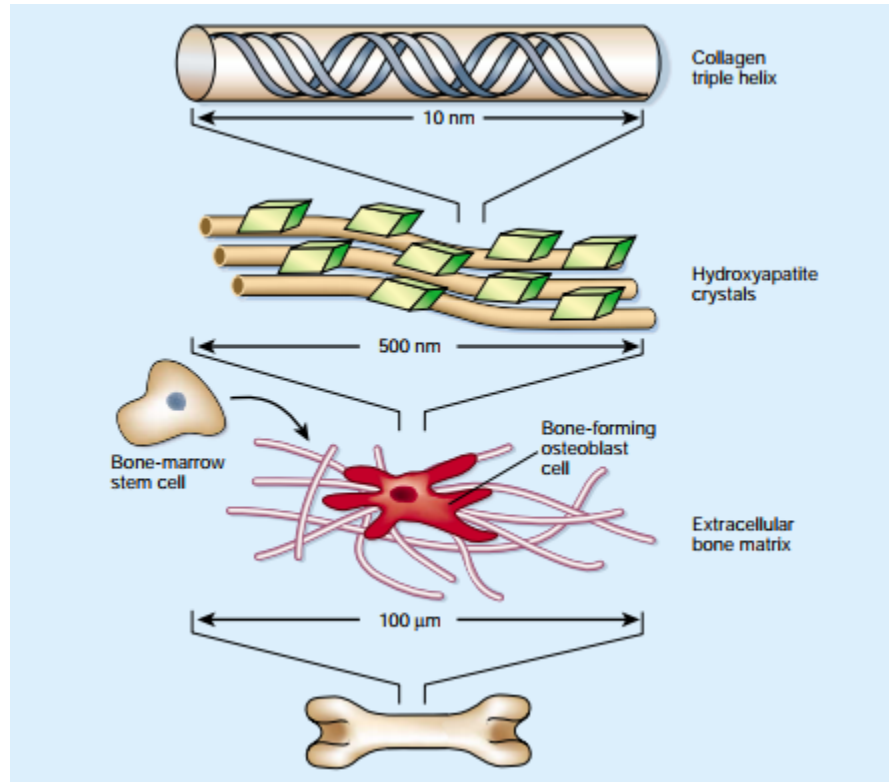


Figura 3. Representación esquemática del proceso de cristalización en el tejido óseo, comenzando con un template de colágeno (triple hélice) donde posteriormente se incorporan las células madre de la medula ósea, convirtiéndose así en células formadoras de hueso: osteoblasto [6].

a) Hueso denso:

A diferencia del hueso esponjoso, en este tipo las laminillas óseas se orientan de forma circular alrededor del llamado conducto de Havers; este conducto posee una pequeña cantidad de tejido conectivo como algunos vasos sanguíneos y una pequeña concentración de células. Estas estructuras de Havers también reciben el nombre de osteonas [4].

1.6. Daños y afecciones al tejido

1.6.1. Fracturas

Uno de los problemas más comunes que afectan al tejido óseo son las fracturas. Una fractura es la falta de continuidad del tejido óseo en cualquier hueso del cuerpo, esta se produce a consecuencia de un esfuerzo excesivo que supera la resistencia del hueso, es decir es la consecuencia de una sobrecarga, la cual se produce en milisegundos. Una fractura, se da también en persona con problemas de osteoporosis, en los cuales la densidad ósea (tanto en la fase mineral como la fase orgánica) se ve disminuida y compromete la resistencia de este.

1.6.2. Cáncer óseo

Otra de las afecciones a los huesos, son los tumores óseos, los cuales hay de diferentes tipos, pudiendo originarse en cualquier tipo de tejido óseo.

El cáncer de hueso es un tumor óseo maligno (canceroso) que destruye el tejido normal del hueso. No todos los tumores de hueso son malignos, de hecho, los tumores óseos benignos (no cancerosos) son más comunes que los tumores malignos. Tanto los tumores óseos malignos como los benignos pueden crecer y comprimir el tejido óseo sano, pero los tumores benignos no se diseminan, no destruyen el tejido óseo y rara vez ponen la vida en peligro.

Los tumores malignos que empiezan en el tejido óseo se denominan cáncer óseo primario. El cáncer que se disemina (metástasis) al tejido óseo proveniente de otros tipos de cáncer (mama, próstata, pulmonar), recibe el nombre del órgano o tejido en el cual se originó el tipo de afección, es daño al hueso conocido como cáncer osteolítico. El cáncer óseo primario es mucho menos común que el cáncer que se disemina a los huesos.

Los tipos comunes de cáncer óseo primario incluyen:

- I. Osteosarcoma: Se origina del tejido osteoide en el hueso. Este tumor ocurre más frecuentemente en la rodilla y en la parte superior del brazo.

Condrosarcoma: Se origina en el tejido cartilaginoso. ocurre con mayor frecuencia en la pelvis en la parte superior de la pierna y en el hombro.

- II. Los tumores de la familia del sarcoma de Ewing (Ewing Sarcoma Family of Tumors, *ESFT*), los cuales suelen originarse en el hueso, aunque pueden también originarse en el tejido blando. Se cree que los *ESFT* se origina a partir de elementos de tejidos nervioso inmaduro en el hueso o en el tejido blando, ocurren con mayor frecuencia a lo largo de la columna vertebral pelvis, piernas y los brazos.
- III. El osteosarcoma ocurre con mayor frecuencia entre los 10 y 19 años de edad.
- IV. El condrosarcoma ocurre principalmente en adultos mayores de 40 años. El riesgo aumenta a medida que la persona envejece.
- V. Los *ESFT* ocurren con mayor frecuencia en niños y adolescentes menores de 19 años de edad y afecta con más frecuencia a los niños que a las niñas

Aunque el cáncer de hueso no tiene una causa claramente definida, se han identificado varios factores que aumentan la posibilidad de padecer estos tumores.

El osteosarcoma ocurre con mayor frecuencia en personas que han recibido altas dosis de radioterapia externa o tratamientos con ciertos fármacos anticancerosos; especialmente infantes.

El diagnostico de este padecimiento se hace con base en la historia clínica y estudios diagnósticos como:

- 1. Rayos X.
- 2. Gammagrafía ósea
- 3. Tomografía computarizada (TC)
- 4. Resonancia magnética (Magnetic Resonance Imaging) MRI
- 5. Tomografía por emisión de positrones PET (Positron Emission Tomography) por sus siglas en ingles.
- 6. El angiograma

7. Biopsia

8. Análisis de sangre

Aunque existen grandes avances en diagnóstico, técnicas quirúrgicas, así como los tratamientos pre y pos-operativos de afecciones al tejido óseo; no existe una estrategia universal que ayude a regenerar y sustituir el material implantado, por tejido nuevo. El procedimiento para alcanzar la meta es largo y antes de pasar a los ensayos *in vivo* y posteriormente a ensayos preclínicos, los ensayos *in vitro* son el primer paso a seguir, para determinar la interacción célula-biomaterial y predecir sus futuras aplicaciones.

1.7. Cultivo celular

Una manera de experimentar la acción de diferentes factores sobre las células y los tejidos consiste en aislarlos de los organismos vivos en que se encuentran y colocarlos en un medio de cultivo donde proliferan (cultivo celular). Es el estudio *in vitro*, que completa el estudio *in vivo* tradicional. Los cultivos se realizan sobre la superficie de una capa de plástico sobre la que pueden crecer las células. Sobre esta capa se añaden diversos elementos necesarios para que las células se desarrollen, tales como componentes de la matriz extracelular, aminoácidos, vitaminas, sales minerales y diversas sustancias como factores de crecimiento. Como los diferentes tipos celulares tienen necesidades nutritivas diferentes, los elementos del medio de cultivo varían dependiendo del tipo celular [5].

El tipo de cultivo celular utilizado en el presente trabajo es el cultivo en monocapa (un tipo de cultivo primario), el cual se basa en que las células crezcan adheridas sobre un soporte sólido regularmente plástico o vidrio. El anclaje es necesario para la proliferación celular y es el método que se utiliza más cotidianamente con la excepción de las células hematopoyéticas (célula con capacidad de transformarse en todos los tipos de células sanguíneas).

Las técnicas de cultivo celular en presencia de polímeros tienen un gran campo de aplicación en ensayos clínicos y terapia. Las células del cultivo necesitan adherirse a una superficie en la cual puedan proliferar y llevar a cabo las funciones para las

cuales se realiza el ensayo [9], el probar materiales como andamios de origen orgánico pueden conferir cierto nivel de biocompatibilidad generando una buena respuesta de proliferación en el cultivo, generando gran confluencia en la zona donde se encuentre dicho andamio.

1.7.1. Adhesión celular:

La mayoría de las células en cultivo, provenientes de tejidos sólidos, crecen en monocapa, adheridas a una superficie y después de subcultivar (transferir células de un recipiente a otro), requieren volver a adherirse al sustrato antes de proliferar. A su vez, antes de adherirse deben secretar proteínas de MEC (Matriz extra celular) y proteoglicanos. Las células cuentan con receptores de superficie específicos para moléculas en la MEC. Normalmente, las células epiteliales aparte de depender de la adhesión a la superficie, también lo son en las adhesiones intercelulares, es por esto que cuando se cultivan en una baja densidad, crecen en forma de parches, puesto que les permite formar uniones de célula con célula [10].

Existen 3 principales tipos de proteínas transmembranales de adhesión:

1. CAMs (Moléculas de adhesión calcio dependientes) por sus siglas en inglés y cadherinas (Calcio dependientes) ambas participan en interacciones entre células homologas.
2. Integrinas. Participan en las interacciones que se llevan a cabo entre la célula y un sustrato tales como receptores para fibronectina, laminina y colágeno. Son heterodímeros y su dominio extracelular es muy polimórfico.
3. Proteoglicanos: Participan en interacciones que se llevan a cabo entre la célula y un sustrato a través de dominios diferentes a las integrinas. Pueden ser receptores de factores de crecimiento de baja afinidad y también pueden estabilizar al factor a su receptor de alta afinidad.

Las proteínas transmembranales de adhesión son el motivo por el cual, para subcultivar células en monocapa, se requiera de proteasas (en el caso del presente

trabajo se utiliza Tripsina), además de las proteasas también se suele agregar un agente quelante (sustancia que forma complejos fuertes con iones de metales pesados) como el *EDTA* (Ácido etilendiaminotetraacético) ya que muchas de esas moléculas de adhesión dependen del calcio [10].

Un cultivo primario es muy sensible e inestable, ya que las células que lo constituyen se están modificando continuamente para adaptarse, por lo que no son poblaciones homogéneas.

Una vez que el cultivo alcanza la confluencia, es decir, cuando comienzan a formar aglomeraciones, las células cuyo crecimiento es sensible a la inhibición por contacto dejarán de dividirse mientras que cualquier célula que haya sufrido transformación tenderá a proliferar aún más. Es importante mantener la densidad celular baja (una manera es realizando sub-cultivos frecuentes) ya que una densidad celular baja ayuda a preservar el fenotipo normal.

Algunas funciones muy especializadas se expresan fuertemente en el cultivo primario, particularmente cuando se llega a la confluencia y en ese momento ocurre la semejanza morfológica más cercana al tejido progenitor [10].

1.7.2. Ventajas del cultivo celular:

Una gran ventaja en el desarrollo de un cultivo celular es que se pueden controlar las condiciones físico-químicas tales como pH, temperatura, presión osmótica, presión parcial de oxígeno y dióxido de carbono. También se pueden mantener controlados los aspectos fisiológicos, tales como hormonas, factores de crecimiento, densidad celular entre otros. Para algunas líneas celulares se han establecido medios definidos los cuales se conoce a detalle su función en el desarrollo del cultivo.

Otra gran ventaja de un cultivo celular es la caracterización y homogeneidad de la muestra. Una muestra de tejido es siempre heterogénea, sin embargo, al cabo de uno o dos pases, las líneas celulares cultivadas son homogéneas, es decir, su morfología y su composición son uniformes. La presión selectiva de las condiciones

de cultivo da lugar a un cultivo homogéneo del tipo celular más vigoroso. A partir de ese momento se pueden obtener replicas idénticas en cada sub-cultivo y las características de la línea celular se conservan durante varias generaciones o de forma indefinida si la línea celular se conserva en nitrógeno líquido. Otra ventaja que ofrecen es el monitoreo de su actividad metabólica por técnicas espectrofotométricas con una sensibilidad muy alta y una gran exactitud, lo que facilita el tratamiento estadístico de los resultados.

1.7.3. Espectrofotometría como herramienta en cultivo celular

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) es una de las técnicas más populares y más utilizadas en el campo de la química y bioquímica. Esta técnica funciona pasando un haz de luz a través de una muestra que se encuentra en un recipiente transparente (permitiendo el paso de luz) y se mide la transmitancia de la luz respecto a la muestra. A partir de la transmitancia (T), se puede calcular la absorbancia (A) utilizando el logaritmo negativo de T, de modo que $A = -\log(T)$. Esta técnica se utiliza de manera cualitativa para determinar la existencia de una molécula o compuesto a partir de la coincidencia con su espectro de absorbancia ya que la cantidad de esta última a cierta longitud de onda se debe a la estructura química de la molécula.

En cultivo celular, la técnica de UV-Vis se utiliza para medir la proliferación del cultivo o bien, para determinar la existencia de ciertos compuestos que indirectamente indican la concentración celular en el cultivo [19].

La técnica de UV-Vis también es utilizada para medir las concentraciones de compuestos químicos en fluidos biológicos y alimentos en los cuales muestra resultados para realizar un diagnóstico médico o bien, para controlar las concentraciones de químicos en los alimentos, es por eso que es una técnica que involucra diversas disciplinas en su aplicación [20].

Las ventajas mencionadas anteriormente son características técnicas convenientes del cultivo, pero no podemos dejar de lado la parte económica. En los cultivos

celulares se emplean disoluciones con una concentración mucho menor que en el caso del animal completo y garantiza el acceso directo de la sustancia a las células sin que se diluya y sin que sufra ningún tipo de modificación metabólica. El coste de los ensayos clínicos se reduce considerablemente y se puede hacer un mayor número de pruebas. También reducen los costes relacionados con la fabricación del posible nuevo medicamento: en lugar de fabricar cantidades del orden del gramo basta con que se sintetizen unos cuantos miligramos.

1.7.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El avance en la ciencia nos permite el uso de técnicas como la microscopia electrónica de barrido, para el análisis y observación de los nuevos materiales que se desarrollan. Esta técnica utiliza electrones en vez de luz para formar una imagen, los electrones interactúan con la muestra colocada para así generar una imagen que refleja sus características superficiales, arrojando información de forma, textura y composición.

Para llevar a cabo esta técnica es necesario que la muestra estudiada esté compuesta por un material conductor, en caso de no contar con ello, se procede a recubrir la muestra con un recubrimiento el cual tenga las características de un material conductor. En este caso se introdujo la muestra a evaporación térmica para ser recubierta por una ligera película de oro, de tal modo que ya podía ser estudiada [22].

1.7.5. Espectrometría de dispersión de energía (EDS)

Una de las técnicas que se emplean para el análisis químico por SEM, es a través de una microsonda electrónica que permite llevar a cabo este análisis tanto cuantitativo como cualitativo. Esta técnica detecta la presencia de un compuesto o elemento en una muestra. Para esto, se mide la energía del rayo X característico del elemento que se produce por la interacción del haz de electrones con la muestra en cuestión, tomando así la referencia de la energía característica del elemento del que proviene (rayos X), relacionándolo con el elemento al que corresponde. Esta

técnica se utiliza a menudo para corroborar la presencia de un elemento que mediante técnicas físicas o químicas ha sido incorporado a la muestra. Es útil en la identificación de óxidos que han sido caracterizados mediante técnicas de imagen como SEM y TEM [21].

2. Antecedentes

2.1. Tratamientos actuales para afecciones del hueso

2.1.1. Fracturas

Además de la estabilización mecánica de la fractura por medio de:

1. Inmovilización con férula.
2. Reducción abierta y fijación interna, la cual se realiza por medio de una operación quirúrgica para reparar la fractura. Con frecuencia se utilizan varillas de metal (Acero inoxidable o titanio), tornillos o placas para reparar el hueso por debajo de la piel.
3. Reducción abierta y fijación externa, en este caso se requiere una operación quirúrgica para reparar la fractura y la colocación de un aparato para fijación externa del miembro fracturado, normalmente empleado en fracturas complejas.

El tratamiento en algunos casos también puede incluir el uso de materiales para relleno o de fijación, como lo son los cementos óseos como el poli-metilmetracrilato (PMMA) [y los cementos de fosfato de calcio [11], [12].

Existen diversos dispositivos modernos que actúan mecánicamente para unir dos secciones del tejido separadas por una fractura, estos dispositivos utilizan diversos métodos para mantener inmóvil al tejido y así, aproximar las partes afectadas para lograr la mejor recuperación posible [13].

2.1.2. Tumores óseos

Por otro lado, en el tratamiento de afecciones al tejido óseo se identifican muchas variables que hacen requerir uno u otro procedimiento.

Las opciones de tratamiento para el cáncer de hueso incluyen:

- Cirugía: Siendo el método más empleado en este tipo de afecciones, consiste en la remoción del tumor y un poco de tejido circundante para garantizar mayor eficacia de la intervención.
- Quimioterapia: Es el uso de fármacos anticancerosos para eliminar las células cancerosas, para tumores óseos los principales tratamientos de quimioterapia incluyen: Dactinomycin, Denosumab, Methotrexato.
- Radioterapia: También llamada terapia de radiación es un tratamiento del cáncer que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores. En dosis bajas, la radiación se usa en rayos-x para ver el interior del cuerpo, como en radiografías de los dientes o huesos fracturados.
- Criocirugía: Es el uso de nitrógeno líquido para congelar y destruir las células cancerosas.

La organización mundial de la salud (OMS) clasifica histológicamente a los tumores óseos, un ejemplo de estos (tumores) es el Osteosarcoma, el cual se divide en tumores centrales, intramedulares y de superficie, cada uno con una gran variedad de subtipos [14].

Grandes avances en técnicas quirúrgicas, así como los tratamientos pre y pos-operativos de los tumores, están haciendo posible mejorar la calidad de vida del paciente con esta enfermedad. Uno de ellos, es la remoción quirúrgica del tumor y relleno de la cavidad obtenida con cementos óseos, que son inyectados y que solidifican ofreciendo un relleno biocompatible.

2.1.3. Materiales como sustitutos óseos

El desarrollo de los CFC (Cementos de fosfato cálcico) abrió grandes expectativas, debido a la posibilidad de utilizar un material moldeable, que se adapta perfectamente al defecto óseo y capaz una vez instalado de fraguar a temperatura ambiente, los CFC son una gran ventaja a las cerámicas para la liberación de fármaco de forma prolongada, puesto que el medicamento puede incorporarse en todo el espesor del cemento, añadiéndose a una de sus fases y no solo en su superficie. [15]

Además de estos, uno de los principales tratamientos para una afección en tejido óseo, es el inyectar PMMA dentro de la cavidad dejada [5], usándolo como relleno en la zona donde ha sido removido o se ha perdido el tejido [12] sin embargo, Mathis M. John, menciona algunos de los problemas al utilizar esta técnica, tales como:

Fugas del material de relleno, donde en el caso de fracturas por osteoporosis las complicaciones representan menos del 1%, pero esto incrementa de 2 a 5% cuando se trata de un tumor metastásico osteolítico [12].

Las complicaciones asociadas a fugas del material de relleno (PMMA), por ejemplo, en el tratamiento de vertebras colapsadas, puede generar una compresión y/o efectos embólicos en las estructuras adyacentes. En estos tratamientos, los casos de fugas se presentan entre 5 y 15% de los casos aproximadamente, pudiendo comprometer al tejido pulmonar o incluso ocasionar la muerte en el 25% de los casos en que se aplica un relleno relativamente grande, la fuga puede ir hacia el espacio del disco ocasionando que la vértebra adyacente colapse, el daño más severo de una fuga, menciona Mathis, ocurre localmente irritando el nervio adyacente [12].

Por otro lado, se sabe que la tasa de complicaciones cardiacas después de haber administrado una inyección de un cemento óseo como los de PMMA va aumentando con el tiempo a medida que la población que recibe estas intervenciones, envejece [16].

Ang T.H. *et al.* Mencionan en *cementos óseos acrílicos modificados con hidroxiapatita para implantes* [17] la importancia de este material debido a sus excelentes propiedades mecánicas y su alta biocompatibilidad. Al colocar un cemento óseo se está sustituyendo por hueso que ocupaba anteriormente esa zona. El material le confiere estructura y rigidez a la zona dañada mas no ofrece la formación de un tejido nuevo por el mismo organismo, sino que sirve solamente como relleno [17].

El andamio obtenido en el presente trabajo brinda una base para la formación de un nuevo tejido, que el mismo organismo a través de las células formadoras de hueso, sintetiza gracias al templete de colágeno colocado; no solo se está remediando el problema de la ausencia del tejido por algún padecimiento, sino que se está impulsando la regeneración del mismo.

En un estudio reciente [18] mencionan las características que hacen del colágeno un material biocompatible y viable para el uso de andamios de este tipo en sectores como agricultura y medicina. Un andamio de colágeno es un material que puede ser utilizado como un templete mediante células generadoras de un tejido debido a las altas concentraciones de esta proteína en el cuerpo, es decir; un material que funja como un primer e indispensable paso en la síntesis de nuevo tejido [18].

3. Planteamiento del problema

Con estos antecedentes, se evidencia la necesidad de buscar alternativas a tratamientos para afecciones óseas, evitando las complicaciones o efectos secundarios de los tratamientos convencionales, buscando un sustituto óseo que tenga la estructura tridimensional del hueso a sustituir, que este compuesto por materiales biocompatibles, biodegradables y que sirvan como centros de enucleación de la fase mineral del tejido óseo.

4. Hipótesis

Mediante la desmineralización de tejido óseo se puede obtener una matriz orgánica de colágeno tipo I que funja de template para formación de nuevo tejido óseo y que al mismo tiempo permita la incorporación de nanopartículas biocompatibles.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general:

Desarrollar un andamio celular formado por una matriz de colágeno el cual permita incorporar nanopartículas biocompatibles, que puedan fungir como nanovehículos.

5.2. Objetivos específicos:

- Obtención de matriz orgánica mediante desmineralización del tejido óseo por medios ácidos.
- Integración de nanopartículas al andamio celular tridimensional de colágeno tipo 1.
- Obtener el andamio colágeno-nanopartícula.
- Realizar los ensayos de Inmunogenicidad, viabilidad celular y fagocitosis con células Raw Blue (macrófagos murinos).

6. Materiales y reactivos

- Ultracentrífuga Beckman Couture
- Centrifuga Thermo Multifuge X1R
- Zetasizer Nano de Malvern Instruments
- Agitador rotativo minilab roller.
- Campana de bioseguridad numero 2
- Espectrofotómetro para placa multipozo a longitud de onda variable Thermo Fisher Scientific.
- Incubadora 37 grados C. con atmosfera de dióxido de carbono.
- Placa multipozo 96,48.
- Tubo eppendorf 1.5 mL.
 - Cultivo de células RAW-blue
- AlamarBlue™ (Resazurina) InvitroGen

- Sulfonamida y NED (Reacción de Griess)
- DMSO (Dimetil sulfoxido) como control.
- Ácidos: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico en concentraciones de 0.1-1 M
- Acetato sódico
- Partículas Sigma-Aldrich TiO₂ de estructura Octaedrita (anatasa) 99% de pureza.
- Cámara de Neubauer
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- RAW-Blue™ Cells
- QUANTI-Blue™ InvivoGen

Metodología

Obtención de la matriz de colágeno

El primer paso fue la obtención del andamio de Colágeno tipo I por lo que se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Para comenzar con la obtención de la matriz de colágeno tipo I, se tomó un segmento de un fémur bovino, este se cortó en trozos de aproximadamente 0.5 cm de lado. Este paso se realizó de esta manera para tener muestras pequeñas donde los posteriores tratamientos químicos pudieran causar un mayor efecto ya que habría más superficie expuesta donde pudiesen penetrar los reactivos.

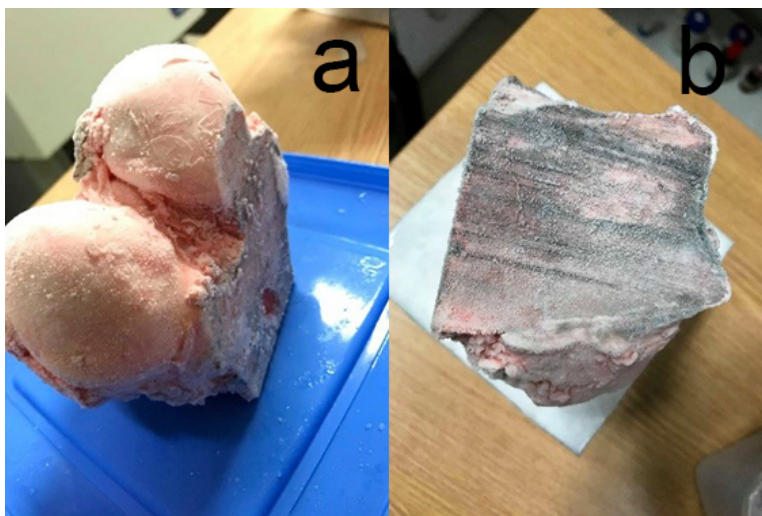


Figura 4. Imagen (a) de la sección de fémur utilizado para obtener los pequeños segmentos de 3x3 cm. En la imagen (b) se aprecia el segmento transversal de la diáfisis del tejido.

Ya que se tuvieron las muestras del tamaño deseado, se les añadieron los solventes requeridos para la eliminación de grasas y materias residuales, utilizando Metanol y Cloroformo (50% v/v) y se colocó en sonicación constante durante lapsos de 20 minutos monitoreando el avance de la eliminación de materias grasas y residuales. El cambio de solución de metanol-cloroformo (50% v/v) se cambia de manera constante dependiendo del avance en la limpieza de las muestras, se deduce a simple vista dependiendo de la turbidez de la solución en la que se encuentren;

cuando la solución permanece aún transparente después del lapso de sonicación, se procede a cambiar de reactivos, los reactivos que se utilizaran cuando esto suceda serán: Acetato de sodio, Ácido clorhídrico, Ácido sulfúrico y Ácido fosfórico para comenzar con la desmineralización de la muestra. Se añaden los reactivos a diferentes concentraciones desde 0.01M. hasta 1M. dependiendo del avance que tengan en la desmineralización de las fibras de colágeno. Ya que los ácidos y el acetato sódico muestren que está bajando la efectividad en la desmineralización (se observa cada vez menos turbidez en la solución) lo que se hace es aumentar gradualmente las concentraciones de los reactivos utilizados (se optó por aumentar de 0.01M a 0.1M y observar el avance de la desmineralización, dependiendo de la efectividad sin dañar la muestra se aumentaba o disminuía la concentración).

Una vez obtenido el andamio solo de colágeno tipo I, se sometió a un proceso de deshidratación con diferentes concentraciones de etanol, la cual se llevó a cabo aumentando la concentración en intervalos de 60 minutos, hasta llegar al etanol absoluto, tal y como se muestra en la figura 5.

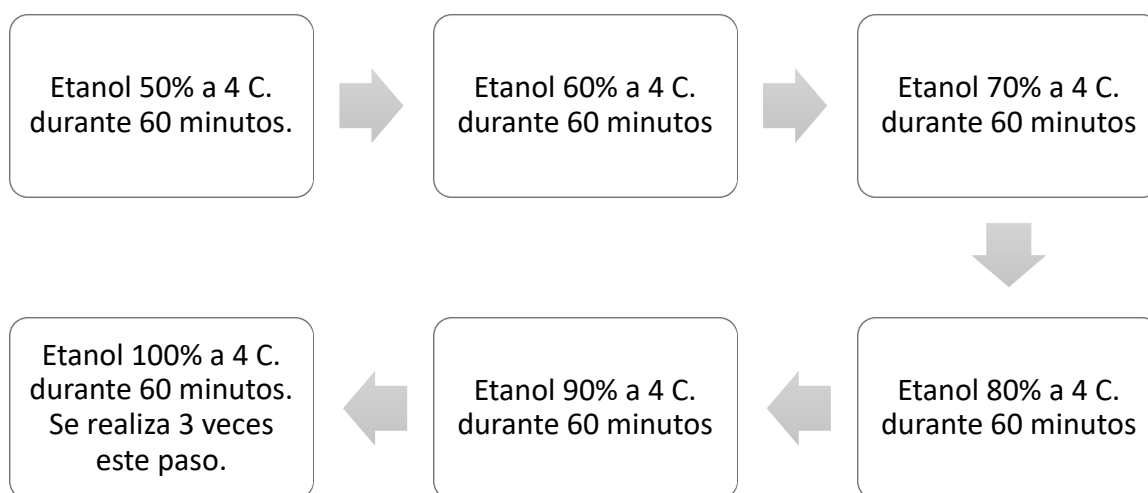


Figura 5. Se muestra procedimiento de deshidratación con diferentes concentraciones de etanol [desde 50%(v/v) hasta 100% (v/v)].

Una vez que las muestras salen del tratamiento con alcohol, se colocan bajo campana de extracción, para que por evaporación del etanol este complete su procesamiento de deshidratación. Posteriormente se realiza el proceso de evaporación térmica de oro, sobre la superficie del andamio para observarlas por microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés).

6.1. Estabilización dimensional del andamio de colágeno.

La estabilización de la estructura tridimensional del andamio de colágeno se logró con la interacción de quitosano y el componente principal del andamio: el colágeno. Esto se llevó a cabo haciendo una adaptación de los protocolos de Koyani R y Vazquez-Duhalt [23] en los cuales se emplea una solución de quitosano/ácido acético al 2% (v/v), previamente filtrada. Se colocaron los andamios de Colágeno tipo I junto con la solución de quitosano, en un agitador rotativo de laboratorio durante aproximadamente 48 horas. El ácido acético aparte de ayudar a disolver el quitosano, ayuda a dejar libre los grupos amino y carboxilo (generalmente de Glicina, Prolina e hidroxiprolina) terminal de cada molécula de colágeno, con la finalidad de tener un sitio de reacción para unir la molécula del biopolímero a las fibras de colágeno.

6.2. Incorporación de nanopartículas de TiO₂ al andamio.

Además de estabilizar el andamio de colágeno, se procedió a la incorporación de nanopartículas de TiO₂ en su superficie, para lo cual se utilizaron partículas de óxido de titanio de estructura octaédrica anatasa, con dimensiones de 18-22 nm de radio hidrodinámico, (99% de pureza de la casa U.S Research materials).

Para incorporar las nanopartículas al andamio, los andamios fueron previamente colocados en agitación constante en la solución de quitosano/ácido acético durante 48 horas. Concluido este lapso, se retiró la solución y se añadió una solución nueva a la cual se le agregó la cantidad requerida de nanopartículas (aproximadamente 0.1 g /en 10 mL) junto con la solución de glutaraldehído 0.1% v/v y se dejó en agitación constante con ayuda de un agitador rotativo durante dos días a

temperatura ambiente. La adición del glutaraldehído es para proporcionar una mejor adherencia a las nanopartículas con el andamio de colágeno.

Una vez concluido este periodo de tiempo, se retiraron los andamios Colágeno/quitosano/NPsTiO₂, de la solución y se inicia el proceso de secado a temperatura ambiente bajo campana de extracción para evitar cualquier tipo de contaminación. Concluido el proceso de secado, se colocó cada andamio en el evaporador térmico para ser recubiertos con una capa de oro del mismo modo que se explicó con anterioridad, para poder ser observados por SEM. En la tabla 2 Se enlistan los diferentes tipos de andamio.

Andamio	Colágeno	Quitosano	Nanopartículas de TiO ₂
Col	✓	X	X
Col Q	✓	✓	X
Col Q TiO ₂	✓	✓	✓

Tabla 2. Se muestran las diferentes composiciones de andamio, la zona palomeada en cada celda oscura indica los componentes de cada muestra.

6.3. Ensayos in vitro

Antes de comenzar con el cultivo, los andamios fueron previamente pre-hidratados dentro de una caja multipozos de 48, durante una noche en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibiotico/antimicotico (anti/anti) a 37 ° C; a esta solución de medio de cultivo suplementado se le conoce como medio completo. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio en el cual se colocaron previamente, (200µl aproximadamente) y se colocó medio DMEM completo nuevo hasta cubrir cada uno de los andamios.

Para los ensayos con células, se seleccionó la línea celular RawBlue (InvivoGen) es una línea establecida a partir de un tumor inducido por el virus de la *leucemia murina Abelson*, las cuales son células derivadas de macrófagos de ratón RAW 264.7 [24]. Estas células en un estado estable expresan una Alcalina Fosfatasa Embrionaria Segregada (*SEAP* por sus siglas en inglés), gen inducible por los

factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Con esta línea se analizó la posible respuesta inmune ante la presencia de un agente extraño como lo es un material implantado, el cual, a pesar de su presunta biocompatibilidad asociada a sus componentes, pudiera desencadenar una respuesta no deseada.

Para garantizar la adherencia de las células a los respectivos andamios, estos se colocaron en una placa multipozos con medio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) y se colocaron en incubadora durante una noche (12 horas aproximadamente). Esto se realizó para que las muestras de andamios estuvieran hidratadas y saturadas de medio de cultivo, para que una vez añadidas las células en la concentración conocida, estas tuvieran un mayor rango de área listo para proliferar.

Una vez que tenemos los andamios de respectiva composición en cada pozo (col, Col_Q, Col_Q_TiO₂ por triplicado para 24, 48 y 72 horas) se siembran aproximadamente 250,000 células.

Como controles se colocaron la misma cantidad de células en una serie de 3 pozos sin ningún tipo de estímulo (Control positivo) y la misma cantidad de células en una serie de 3 pozos a la cual se le agrego DMSO (*Dimethyl sulfoxide* por sus siglas en inglés) al 10%.

6.3.1. Viabilidad celular

Para analizar la viabilidad y la proliferación celular, se utilizó el reactivo Alamar Blue[™] (*InvitroGen*) el cual es un reactivo utilizado en el ensayo de viabilidad celular que contiene un colorante indicador permeable, que no es toxico y un poco fluorescente llamado *resazurina* (figura 6). La resazurina fue introducida en las técnicas de cultivos como un indicador de viabilidad celular no toxica, lo cual es útil para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad, el cual es un compuesto rosado y fluorescente y en segunda instancia se transforma a dihidroresosurifina, que es un compuesto incoloro y que no muestra fluorescencia, estos procesos se asocian principalmente con la mitocondria celular, por lo que una conversión de Resazurina

a los compuestos mencionados, nos indica una actividad mitocondrial activa, por lo que se puede deducir una correcta proliferación celular [25].

Alamar Blue es una alternativa no toxica que puede ser utilizado en lugar del reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenilo). –bromuro de trazolio (O Brien et al. 2000) comúnmente usado en el cultivo. Este reactivo (Alamar Blue) mide cuantitativamente la proliferación en células ya sean humanas, animales y/o bacterias, es útil para los ensayos de viabilidad y la determinación de citotoxicidad *in vitro* así como para el monitoreo del crecimiento celular.

Resazurina es utilizada en una amplia variedad de ensayos para medir la proliferación que va desde el cultivo de células de mamífero, hasta la medición en cultivos bacterianos que afectan al humano [26].

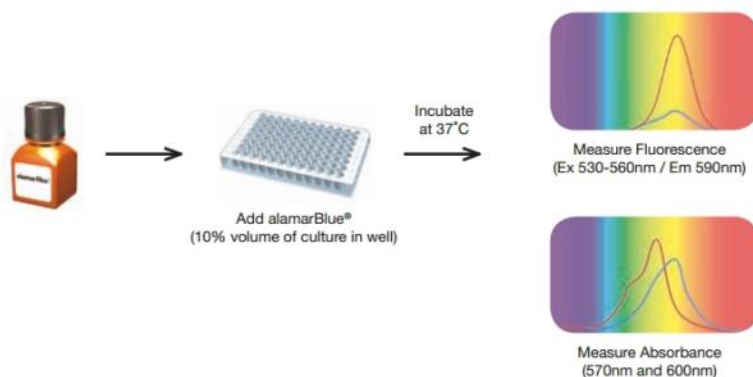


Figura 6. Representación esquemática del procedimiento utilizado con Alamar Blue. (Obtenida del sitio web de Bio-rad instruments).

Para determinar la viabilidad y proliferación celular de las células Raw Blue sobre los diferentes andamios (por triplicado), estas se incubaron por 24, 48 y 72 horas. Una vez pasado del tiempo de incubación correspondiente, se retiró el medio de cada pozo (24,48 y 72 horas.) y se añaden 100 µL de medio con 10% de Alamar Blue (Rezasurina) y se dejó incubar a 37 grados C. por 4 horas. Pasado el tiempo

de incubación se midió la absorbancia a 570 y 600 nm de longitud de onda en espectrofotómetro para placa multipozos.

6.3.2. Fagocitosis (Reacción de Griess)

La reacción de Griess consiste en la diazotización (proceso químico mediante el cual una amina aromática primaria rompe su cadena cíclica para convertirse en un compuesto diazonio) que ocurre en dos pasos. Primero los nitritos acidificados producen un agente nitrosido que reacciona con el ácido sulfanílico para producir el ion diazonio. El siguiente paso de la reacción es cuando el ion diazonio se aparea con N-(1-naftil) etilendiamina para formar el cromóforo azo derivado que absorbe a 540 nm (longitud de onda requerida en el espectrofotómetro para medir la concentración de nitritos en la solución)[27]. La reacción de Griess nos indica la concentración de nitritos en cada pozo de la placa en donde se encuentran las células con una muestra de andamio, una alta concentración de nitritos (NO_2) en comparación al control positivo, podría ser indicio de una respuesta inmune desencadenada por la presencia de un agente externo posiblemente infeccioso como lo es la muestra de andamio en el cultivo.

Una vez pasados los tiempos de incubación correspondientes, se retiraron 50 μL de cada pozo de la placa de 48 y se colocan en una placa multipozos de 96, para analizar la concentración de nitritos en el medio de cultivo por medio del reactivo Griess. A temperatura ambiente y en medio no estéril, se colocan 50 μL de Sulfonamida.

Colocado el volumen requerido de Sulfonamida se deja incubar a temperatura ambiente cubierto de cualquier fuente de iluminación, por 10 minutos dejando que ocurra la reacción correspondiente (en donde los nitritos forman una sal de diazonio) y posteriormente se añade el reactivo NED (N-1-naftiletildiamina) dejándolo incubar durante otros 10 minutos en las mismas condiciones. Transcurrido este lapso de tiempo, se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro

6.3.3. Ensayo de Inmunogenicidad

El ensayo de inmunogenicidad consiste en la determinación de este ensayo requiere que las muestras hayan sido incubadas previamente por espacio de 12 a 18 horas. Una vez pasado el tiempo de incubación se colocan 50 μ L del sobrenadante de cada muestra en una placa multipozos de 96 y se adicionan 150 μ L del reactivo QUANTI-Blue™, se incubaron por espacio de 60 minutos y se midió la absorbancia a 650 nm en el espectrofotómetro. El reactivo QUANTI-Blue™ (InvivoGen®) está diseñado para detectar los niveles de fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) por sus siglas en inglés [15], en muestras biológicas ya sean sobrenadantes celulares o plasmas de ratón; esta última es la utilizada como indicador en el presente trabajo de tesis. La activación de la vía de señalización conduce a la translocación del factor de transcripción, y su unión al elemento de respuesta, induce la producción de la proteína indicadora (*SEAP*), la que se midió usando un espectrofotómetro desde tan solo 15-30 minutos tras la incubación de las muestras con el reactivo.

7. Resultados

7.1. Obtención del andamio

El primer objetivo del trabajo, fue el obtener los andamios de colágeno tipo1 provenientes de segmentos de hueso esponjoso bovino. En la figura 7 (a) se aprecia un segmento con medidas de 3x3 cm aproximadamente, las cuales fueron utilizados para someterlos al tratamiento por medios ácidos.

En la parte superior del bloque, se puede apreciar un borde más continuo y liso el cual corresponde a la cortical que rodea al hueso esponjoso. Es importante remarcar que esta parte fue eliminada de varios bloques, con ayuda de un bisturí, una vez que alcanzaban una desmineralización adecuada para retirarlo sin dañar la estructura de colágeno.

Como primera característica del andamio observamos que el bloque obtenido es un andamio tridimensional resiliente ya que se comprobó que este mantenía su estructura tridimensional. En la imagen 7-a, se observa la porosidad y estructura tridimensional obtenida después del proceso de descelularización y desmineralización del bloque mientras que en la 7-b se muestra la flexibilidad y facilidad con la que este es manipulado y como retoma su forma.

Una vez concluida la fase de desmineralización, se procedió a la incorporación de las NPs de Titanio, para lo cual se utilizó una solución de quitosano/ácido acético al 2% (v/v) y glutaraldehído como agente entrecruzante, tal y como se describió en la metodología.

Una vez obtenido el andamio, se procedió a su observación por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) por sus siglas en ingles.

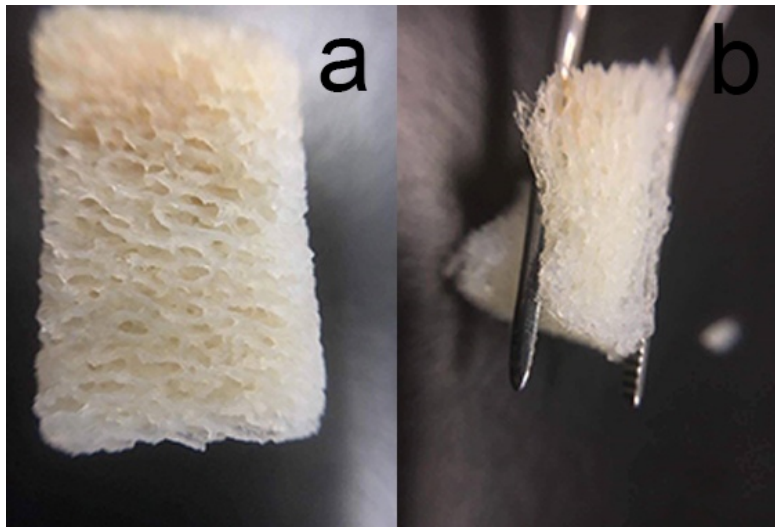


Figura 7. En la imagen (a) se muestra la estructura de colágeno tipo I después de la desmineralización por medios ácidos. En la imagen (b) se muestra la compresibilidad de la estructura obtenida, demostrando así el modo en que se mantiene la estructura de hueso esponjoso una vez desmineralizado el andamio. Fotografía tomada con una amplificación 2X.

7.2. Caracterización de los andamios.

La figura 9 se compone de las imágenes obtenidas por SEM. La imagen (a) muestra al andamio de colágena entrecruzado con quitosano utilizando glutaraldehído 0.1M. lo cual le confiere la conservación de la estructura trabecular del tejido esponjoso aun a escala microscópica (escala de 800 micrómetros mostrada en la figura). En la imagen b se observa un andamio C en el cual no se pueden diferenciar los poros ya que este no pudo mantener la tridimensionalidad y la estructura trabecular original del tejido esponjoso. Con esta comparación podemos deducir que el andamio C_Q debido al entrecruzamiento con el quitosano hace que se mantenga la estructura de interés.

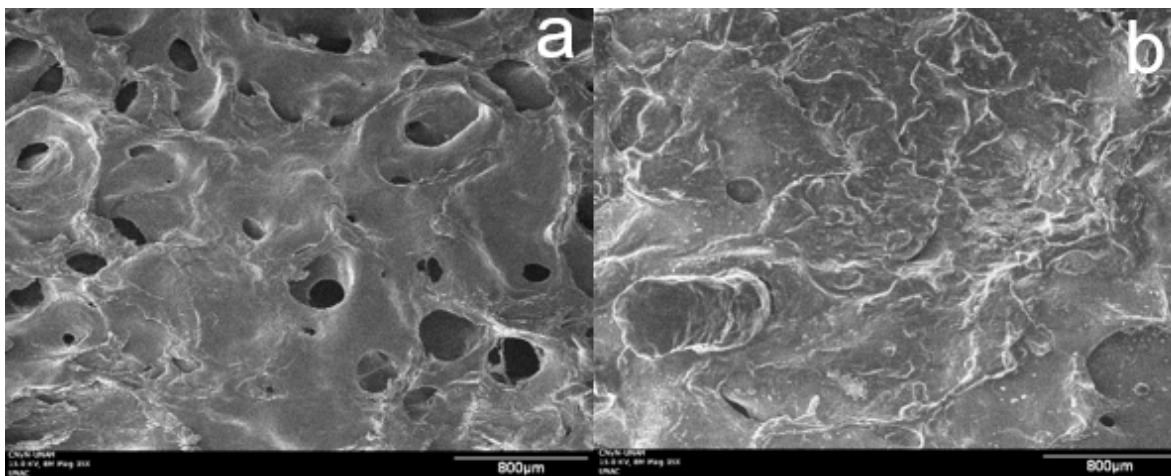


Figura 8. Imágenes obtenidas mediante SEM. La imagen (b) es obtenida del andamio Col_Q y la imagen(a) muestra el andamio de Col.

En la figura 8 se muestra una microfotografía del andamio de colágeno. En la imagen a se observa la estructura del andamio Col_Q, se notan los poros característicos de la estructura trabecular del tejido. En la imagen b se muestra el andamio Col y se puede apreciar como a escala microscópica no se mantiene la estructura porosa. La estructura porosa se mantiene solamente cuando al andamio le es suministrada la solución de ácido acético/quitosano (Col_Q).

En las imágenes de la figura 9 obtenidas mediante SEM del andamio a y c muestran como a escala microscópica (micrómetros) se mantiene la estructura trabecular característica del hueso esponjoso perteneciente al tejido óseo. Mientras que en las imágenes c y d se aprecian con detalle las fibras de colágeno debido a su disposición longitudinal y su organización en fascículos continuos y que además están cubiertas de partículas irregulares, las cuales son aglomeraciones de nanopartículas de óxido de titanio incorporadas a los andamios.

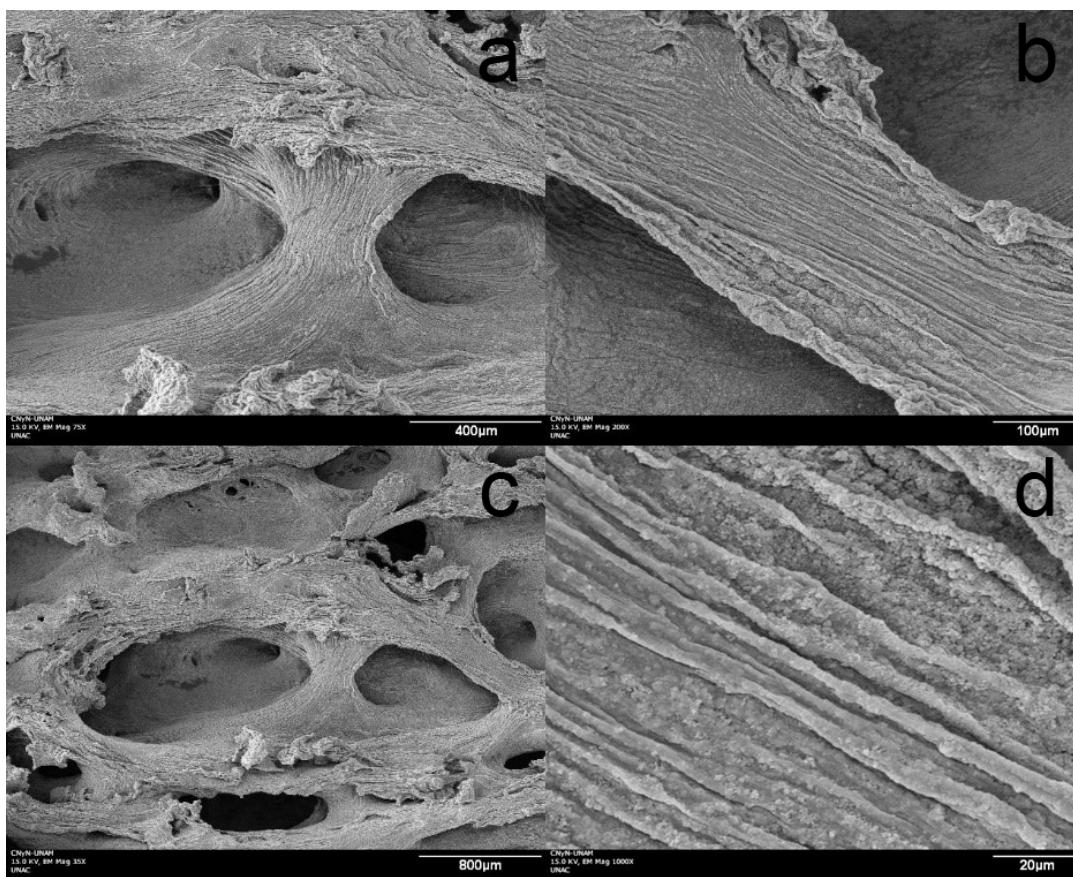


Figura 9. La figura 4 está compuesta de imágenes del andamio Col_Q_TiO₂. En las imágenes a y c se observa cómo se mantiene la estructura trabecular a escala microscópica. En las imágenes b y d podemos observar como las fibras colágenas están saturadas por aglomeraciones de nanopartículas de TiO₂, lo cual se aprecia detalladamente a lo largo de la fibra en la imagen d.

Se llevó a cabo una caracterización mediante espectroscopia de dispersión de electrones (EDS por sus siglas en inglés), del andamio de la figura anterior, en la cual se pueden identificar los picos característicos de elementos como: oxígeno y principalmente titanio (Figura 10), elementos constituyentes del TiO₂, así como oro.

En el caso de la señal de oro (2000 KeV), esta se debe a la capa adherida por evaporación térmica a la superficie del andamio para facilitar la interacción de los electrones con el andamio. Por otro lado, es fácil identificar el pico de gran intensidad correspondiente al titanio (4500 KeV), el cual proviene de las nuestras nanopartículas de TiO₂, lo cual nos corrobora su presencia sobre la superficie de las fibras de colágeno.

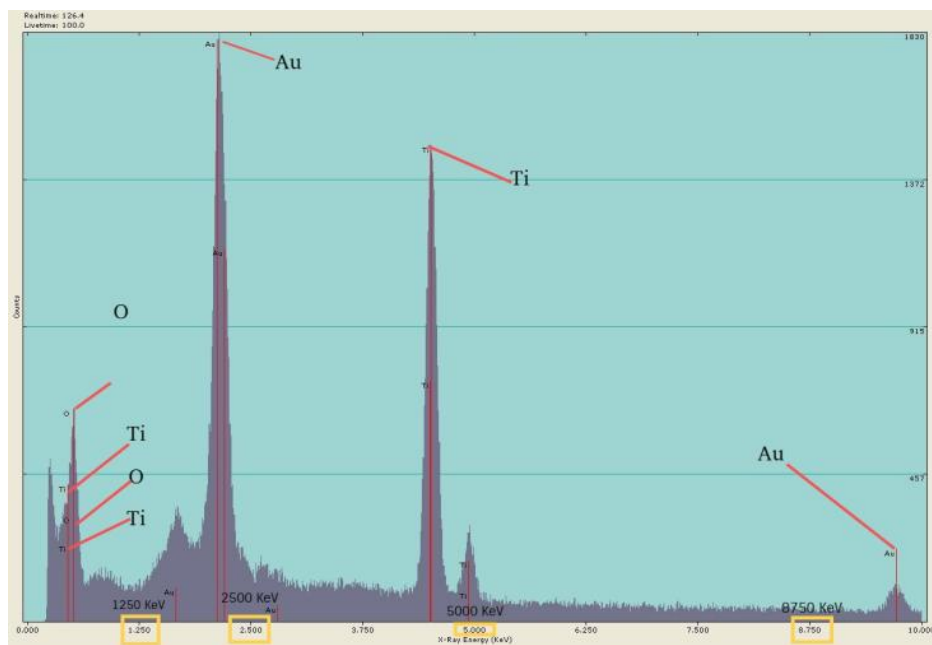


Figura 10. Análisis mediante EDS el cual nos muestra los picos característicos para Ti, O y Au a diferentes energías, (KeV) muestra los elementos existentes en el andamio analizado.

7.3. Cultivo Celular.

En el caso de los ensayos con células, en la figura 11 se aprecia la gráfica de viabilidad celular, donde se representan las mediciones de las absorbancias para las diferentes muestras colocadas, son similares entre ellas en los diferentes tiempos. Sin embargo, en el caso del control positivo podemos ver que a 24 horas la absorbancia presenta un valor más alto que las muestras experimentales. En el control negativo (C-) no se distingue una diferencia en absorbancia considerable hasta la tercera medición a 72 horas

Por otro lado, en la gráfica mostrada en la figura 12 se distingue el efecto de la presencia de los andamios en las células, por la concentración de nitritos liberados en el medio de cultivo en concentraciones de micromolares (μM). Se considera como la concentración de nitritos en las diferentes muestras (*Col*, *Col_Q*, *Col_Q_TiO₂*) se asemeja a la concentración de nuestro control positivo (C+) indicando que nuestro material no incrementa la cantidad de nitritos solubles.

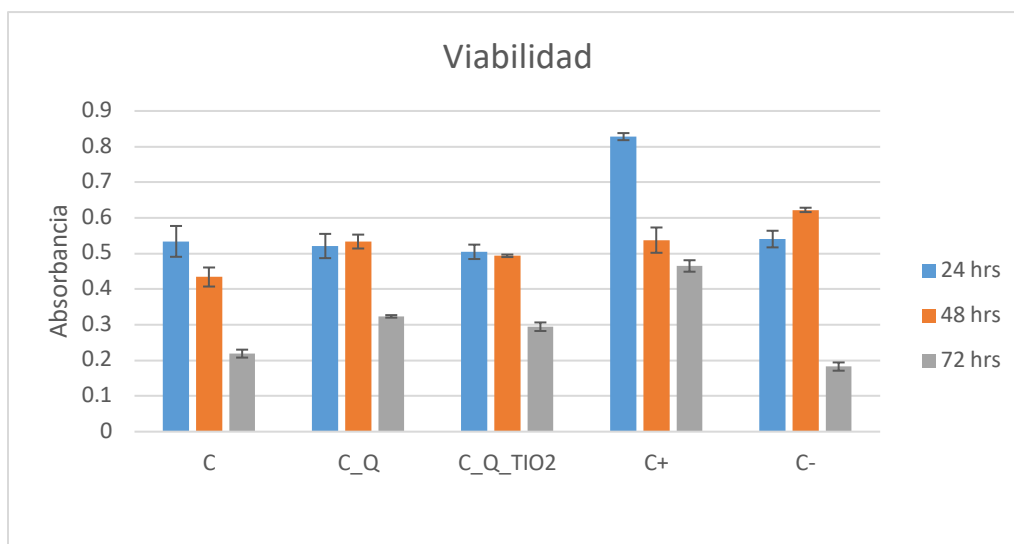


Figura 11. Grafica de viabilidad celular. Indica la absorbancia dependiendo la composición de cada muestra, se observa una viabilidad adecuada para todas las mediciones con andamio en comparación con el control positivo (C+).

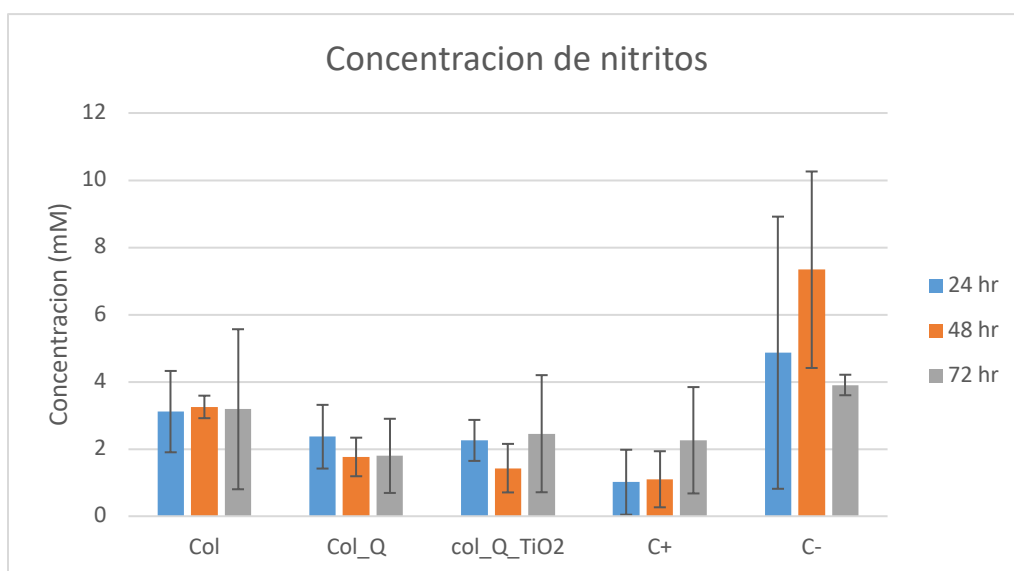


Figura 12. Representación gráfica de la concentración de nitritos medidos en la reacción de Griess.

Finalmente se puede apreciar en la figura 13 los resultados de una reacción de activación de receptores de macrófagos tipo Toll-Like Receptors (TLR por sus siglas en inglés) como un ensayo previo de respuesta inmune. Para este ensayo, se

colocaron 75 ng/mL de LPS (lipo-poli-sacáridos) como control de respuesta inmune celular y compararla con las diferentes muestras del cultivo. En la gráfica se puede observar la respuesta de los macrófagos a los LPS por una alta concentración. Mientras que en los pozos donde se nuestros andamios (*Col*, *Col_Q*, *Col_Q_TiO₂*), la absorbancia es muy semejante a las que presenta en los pozos donde se colocaron solamente células.

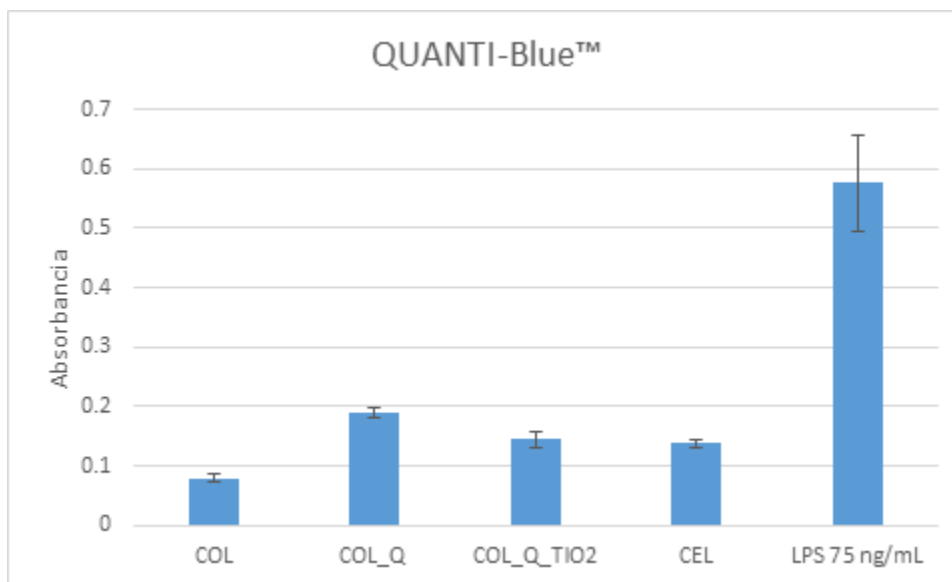


Figura 13. Obtención de absorbancias mediante el reactivo QUANTI-Blue™ [24] en el ensayo de inmunogenicidad por activación de receptores tipo Toll de células Raw Blue con 75 ng de LPS. Se muestran las medidas correspondientes a los diferentes tipos de andamio analizados en este estudio, comparados con la muestra del cultivo celular sin algún agente externo (CEL).

8. Discusión

La gran problemática que se vive actualmente respecto a padecimientos en tejido óseo, ha abierto paso a la investigación y desarrollo de nuevos materiales y procedimientos para encontrar una solución viable y segura para la sociedad.

Las necesidades actuales de la ingeniería de tejidos requieren de un biomaterial, con las características tridimensionales y topográficas, que permitan el crecimiento en su interior del tejido remanente sano para que se lleva a cabo la regeneración del tejido, usando como soporte el biomaterial implantado [28]. Sin embargo, no existe un material que cumpla con todas estas funciones. Karageorgiou y colaboradoras mencionan la relación que existe entre la porosidad (frecuencia) y el tamaño del poro de biomateriales utilizados para regeneración tisular, sintetizados mediante impresión 3D. Concluyeron que la síntesis artificial de estos andamios limita la osteogénesis debido a la periodicidad de los poros y tamaños de los mismos, recomendando así, que la medida del poro adecuada para llevarse a cabo el proceso (osteogénesis) sea mayor a los 300 nm [29].

Por lo tanto, este trabajo de tesis se enfocó en obtener un andamio de colágeno que tuviera la estructura tridimensional, la porosidad con la composición propia del hueso, que ofrezca una estructura óptima para la nucleación de cristales por las células formadoras de hueso sobre un andamio de fibras colágenas. Este lo pudimos lograr mediante el proceso de descelularización y desmineralización de hueso bovino. Además, dada la composición del andamio, es posible incorporar nanopartículas de TiO_2 sobre su superficie, ofreciendo una ventaja sobre lo que se estudia actualmente.

Mandal & Kundu [30] analizaron las propiedades de proliferación en andamios de fibras de seda mediante impresión 3D. Lo que observaron fue que mientras menor es la temperatura del proceso de impresión del andamio y la adición de fibras al mismo, (alcanzando temperaturas de hasta $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), las células tenían una mayor movilidad entre los poros del andamio, los autores reportan un nivel de confluencia

mayor cuando era sintetizado su andamio (seda) bajo estas condiciones. Controlar esto puede llegar a ser complicado y costoso.

Si comparamos el procedimiento empleado en nuestro trabajo, nuestro procedimiento se realiza a temperaturas alrededor de los 5°C, utilizado para llevar a cabo el proceso de desmineralización celular. Por lo tanto, nuestro trabajo usa proporciona un manejo más sencillo, económico y con alta probabilidad de éxito, en la obtención de un andamio con las características necesarias para tener una buena respuesta celular.

Si comparamos nuestro andamio con el desarrollado por Mandal y colaboradores [30], por medio de un método de impresión capa por capa (*rapid prototyping robotic dispensing*) de quitosano y quitosano-hidroxiapatita, podemos ver que la respuesta que obtuvieron con respecto a la interacción entre su andamio y las células, mostraron una proliferación celular aceptable en presencia del material. Sin embargo, al momento de evaluar sus resultados por microscopia (una vez transcurrido el tiempo de cultivo), notaron que en la arquitectura inicial, mostraba una contracción de entre el 31 y 62%. En comparación con este dato, cabe destacar que los andamios *Col*, *Col_Q* y *Col_Q_TiO₂* obtenidos en el presente trabajo, mantienen la estructura del hueso esponjoso trabecular aun después de su desmineralización por medios ácidos y las redes de fibras de colágeno muestran un espaciamiento y tamaño adecuado debido al control y optimización del proceso de desmineralización.

El procedimiento de desmineralización del tejido óseo bovino comenzó con la preparación de los medios ácidos y por planeación respecto a las propiedades de los materiales y equipo a utilizar, sin embargo, durante el proceso se probaron y cambiaron varios pasos. El procedimiento para la obtención del andamio *Col*, estaba contemplado para 10 días; sin embargo, conforme se supervisaba el avance en el proceso, se tomaba la decisión de alargar o acortar los tiempos de refrigeración y sonicación, motivo por el cual se optimizó dicho procedimiento ya que se obtuvo el andamio *Col* en la mitad del tiempo esperado, 5 días.

Con nuestro andamio lo que se hace es obtener el template que las células regeneradoras de tejido (osteoblastos) necesitan para iniciar la mineralización y la síntesis de un nuevo tejido funcional ya que, por la naturaleza del material, la osteoinducción, osteogénesis y osteoconducción, se verán favorecidas, estrategia ampliamente buscada para estos tratamientos [28]. En este caso no se emplea un sustituto artificial como los cementos de fosfatos de calcio [11], [31], nuestro procedimiento permite ofrecer a los osteoblastos el material necesario para que se forme de nuevo el tejido dañado y como ventaja añadida, este permite que con la incorporación de las nanopartículas de TiO_2 se obtenga un material compuesto de colágeno y nanopartículas que pueden por un lado, proporcionando el andamiaje para la adhesión, proliferación y diferenciación celular como ya se ha reportado [32] y por otro lado actuar como nanovehículos acarreadores de fármacos en el caso de tratamientos que afecten al hueso o moléculas que disminuyan los tiempos de regeneración ósea, ya que estas nanopartículas son viables para una ser modificadas y funcionalizadas dependiendo los requerimientos del tratamiento.

La elección de los materiales se debe a su ya conocida y alta biocompatibilidad [28], [32], [33], el template para la osteogénesis, punto importante ya que no se está sustituyendo un tejido por uno artificial o de relleno (tales como los cementos óseos de PMMA), sino que estamos obteniendo el template necesario para que las células formadoras de hueso puedan actuar a partir de él.

El entrecruzamiento utilizando quitosano, ácido acético y glutaraldehído en sus respectivas concentraciones permiten mantener la estructura natural trabecular de las fibras de colágeno, pero además, estos materiales son utilizados ya en la industria farmacéutica [29]. El quitosano en este caso, tiene dos funciones la primera es ayudar a monodispersar las nanopartículas de óxido de titanio (TiO_2), lo cual permitiría controlar la cantidad de nanopartículas funcionalizadas con fármaco en un momento dado que se le desee incorporar, recordando su alta funcionalidad como nanovehículos, la monodispersión de estas, puede ayudar en el control de la liberación del fármaco o producto que estas transporten.

A diferencia de lo que comúnmente se utiliza en los andamios por impresión 3D tales como los de ABS o PLA [5], [34]–[36], los andamios *Col*, *Col_Q* y *Col_Q_TiO₂* no fueron sintetizados para tratar de simular o sustituir un tejido, sino para dar pauta a la formación de nuevo tejido a partir del template que tiene como base el andamio: colágeno.

En la figura 14 se muestra el andamio que obtuvieron *Rosenzweig D.* y *colaboradores* [37] sintetizados con PLA (ácidopoliláctico) y ABS (Acrilonitrilo butadieno estireno). En las imágenes *c,d* y *e,f* se muestran los andamios de ABS y PLA con una amplificación de 4x tomada con un microscopio óptico convencional, obtenidos por medio de la impresión 3D de *Rosenzweig* y colaboradores. La comparación del andamio *Col_Q_TiO₂* con los impresos en 3D mencionados, sirve para mostrar que la obtención de un andamio con porosidad periódica obtenido mediante tratamientos fisicoquímicos permite mantener la morfología, estructura y tridimensionalidad a uno diseñado y sintetizado mediante una computadora con ayuda de la impresora 3D.

Por otro lado, los resultados correspondientes al cultivo celular tales como: viabilidad y respuesta inmune in vitro, son necesarios para analizar el comportamiento de la célula ante un agente externo, como lo son los 3 andamios: *Col*, *Col_Q*, *Col_Q_TiO₂*, que, aunque son biomateriales ampliamente usados, la diferencia en estructura y conformación, debe ser evaluada.

Las gráficas obtenidas muestran la proliferación celular aun en los 3 andamios obtenidos: *Col*, *Col_Q* y *Col_Q_TiO₂*. Si comparamos la proliferación celular entre los 3 andamios a 24 y 48 horas, podemos concluir que aun en presencia de estos tres materiales las células en cultivo no se ven afectadas significativamente.

Por otro lado, podemos ver que los andamios no tienen un efecto en los receptores tipo Toll de los macrófagos y tampoco existe un efecto significativo en el proceso de fagocitosis, ya que los resultados de QUANTI-Blue y Griess no mostraron diferencias significativas con respecto a las células sin estímulo.

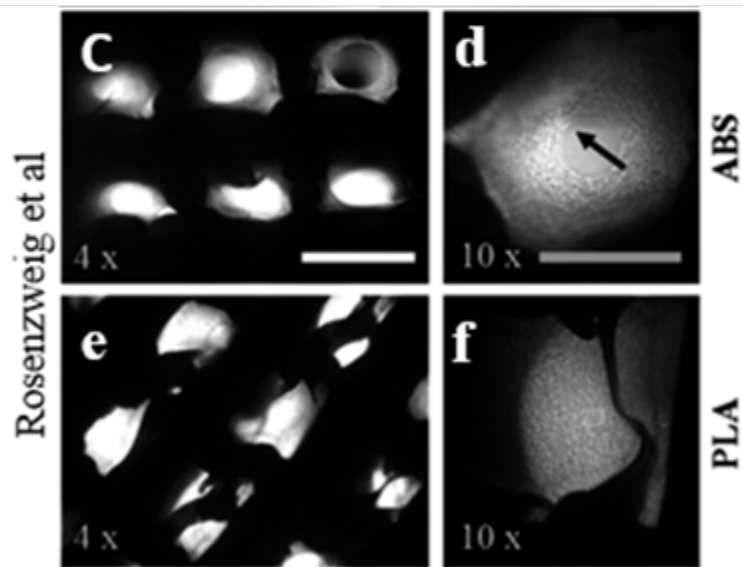


Figura 14. Comparación del andamio Col y los andamios obtenidos por Rosenzweig et al. En las imágenes a y b se muestra el andamio Col obtenido en el presente trabajo con una amplificación 2x. En las imágenes c y d se muestra el andamio sintetizado con ABS con una ampliación 4x. En las imágenes e y f se muestra el andamio sintetizado con PLA.

9. Conclusiones

Se obtuvo un andamio con una topografía y características tridimensionales exactamente iguales a las del tejido que van a sustituir, confiriendo así una solución rápida al problema.

Dado la optimización del procedimiento este pudiera ser factible de escalamiento, lo que abre la posibilidad de aplicación.

La incorporación del TiO_2 , abre la posibilidad de utilizar esta estrategia para colocar algún fármaco deseado directamente en el sitio requerido, controlando la dosis en función de la concentración de TiO_2 por unidad de área.

Los resultados de este trabajo de tesis son el preámbulo para continuar con la investigación en nuevos materiales para regeneración de tejido óseo y el uso de nanopartículas como acarreadoras de fármaco o moléculas específicas funcionalizadas para un tratamiento específico.

10. Referencias

- [1] I. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, M. A. Alobera Gracia, M. del Canto Pingarrón, and L. Blanco Jerez, “Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo,” *Med. Oral, Patol. Oral y Cirugía Bucal*, vol. 11, no. 1, pp. 47–51, 2006.
- [2] R. A. Á. y R. P. G.-Á. Benito Fraile Láiz , Francisco José Sáez Crespo , Manuel Álvarez-Uría Rico-Valdemoro , Manuel Nistal Martín de Serrano , Pilar Sesma Egozcue, *citología e histología vegetal y animal, volumen i. Biología celular*, 4th ed. 2012.
- [3] J. R. Caeiro, P. González, and D. Guede, “Biomechanics and Bone (& II): Trials in different hierarchical levels of bone and alternative tools for the determination of bone strength,” *Rev Osteoporos Metab Min.*, vol. 5, no. 2, pp. 99–108, 2013.
- [4] C. Montalvo, “Biología celular e histología médica.” Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina. Departamento ..., 2010.
- [5] B. Stevens, Y. Yang, A. Mohandas, B. Stucker, and K. T. Nguyen, “A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues,” *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 85, no. 2, pp. 573–582, 2008.
- [6] T. A. Tatton, “Boning up on biology,” *Nature*, vol. 412, no. 6846, pp. 491–492, 2001.
- [7] D. M. Bernales, F. Caride, A. Lewis, and L. Martin, “Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas,” *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas*, vol. 23, no. 2, pp. 65–74, 2004.
- [8] M. Simion and F. Fontana, “Autogenous and xenogeneic bone grafts for the

- bone regeneration. A literature review.," *Minerva Stomatol.*, vol. 53, no. 5, pp. 191–206, 2004.
- [9] J. K. Johnson, "Fiber scaffolds for enhancing cell proliferation in cell culture." Google Patents, 21-May-2019.
 - [10] N. E. Beltran Vargas, "Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos," 2016.
 - [11] M.-P. Ginebra, T. Traykova, and J. A. Planell, "Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review," *J. Control. release*, vol. 113, no. 2, pp. 102–110, 2006.
 - [12] J. M. Mathis, "Percutaneous vertebroplasty: complication avoidance and technique optimization," *Am. J. Neuroradiol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1697–1706, 2003.
 - [13] R. Medoff and J. B. Jupiter, "System and method for treating bone fractures." Google Patents, 07-Aug-2018.
 - [14] T. Ozaki *et al.*, "Osteosarcoma of the pelvis: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group," *J. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 2, pp. 334–341, 2003.
 - [15] J. L. Aparicio, "Un composite nuevo de fosfato cálcico-silicato cálcico para la regeneración ósea: caracterización y comportamiento." Universidad Complutense de Madrid, 2014.
 - [16] P. Shridhar *et al.*, "A Review of PMMA Bone Cement and Intra-Cardiac Embolism," *Materials (Basel)*., vol. 9, no. 10, p. 821, 2016.
 - [17] T. H. Ang *et al.*, "Fabrication of 3D chitosan–hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 20, no. 1–2, pp. 35–42, 2002.

- [18] D. L. Pérez-Osornio and J. A. Amador-Balderas, “Colágeno recombinante como andamios y su aplicación en la ingeniería de tejidos,” vol. 3, 2018.
- [19] B. J. Venton, “Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis),” *Fundamentos de la química analítica. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)*., 2020.
[Online]. Available: <https://www.jove.com/science-education/10204/espectroscopia-ultravioleta-visible-uv-vis?language=Spanish>. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [20] R. Becerra, J. Conde, Y. Cardona, and A. Torres, “Cuantificación del flavonoide quercetina en miel de *Apis mellifera*, mediante DMFS–UV-Vis,” *Semilleros Investig.*, vol. 1, no. 1, 2018.
- [21] J. A. Gómez and E. V. López, “Synthesis and characterization of $\text{La}_{0.8}\text{Sr}_{0.2}\text{Ni}_{1-x}\text{Cr}_x\text{O}_3$ ($x = 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0$) system by the combustion method,” *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.*, vol. 56, no. 6, pp. 273–282, 2017.
- [22] SCAI/UMA, “Microscopía electrónica de barrido,” *Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la universidad de Malaga*, 2016. [Online]. Available: <http://www.scai.uma.es/areas/micr/sem/sem.html>. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [23] R. D. Koyani and R. Vazquez-Duhalt, “Laccase encapsulation in chitosan nanoparticles enhances the protein stability against microbial degradation,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 23, no. 18, pp. 18850–18857, 2016.
- [24] InvivoGen, “QUANTI-Blue™ data sheet catalog code: rep-qb1, rep-qb2,” p. 2.
- [25] L. Escobar and F. A. Aristizábal, “Fluorometric assay for cell proliferation in human tumor cell lines application,” *Vitae*, vol. 17, no. 2, pp. 173–180, 2010.
- [26] S. Foerster, V. Desilvestro, L. J. Hathaway, C. L. Althaus, and M. Unemo, “A new rapid resazurin-based microdilution assay for antimicrobial susceptibility

testing of *Neisseria gonorrhoeae*,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 72, no. 7, pp. 1961–1968, 2017.

- [27] S. Ferraro, Estudios mecanísticos del efecto nocivo de las partículas urbanas de Buenos Aires sobre grupos etarios susceptibles y su modulación por simvastatina en tejidos pulmonar y cerebral. Tesis doctoral, Universidad de San Martin, Argentina, 2016.
- [28] J. Liu and D. G. Kerns, “Suppl 1: Mechanisms of guided bone regeneration: A review,” *Open Dent. J.*, vol. 8, p. 56, 2014.
- [29] V. Karageorgiou and D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, 2005.
- [30] B. B. Mandal and S. C. Kundu, “Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 15, pp. 2956–2965, 2009.
- [31] E. García-Gareta, M. J. Coathup, and G. W. Blunn, “Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration,” *Bone*, vol. 81, pp. 112–121, 2015.
- [32] M. Schwartzmann, “Use of collagen membranes for guided bone regeneration: a review,” *Implant Dent.*, vol. 9, no. 1, pp. 63–66, 2000.
- [33] P. Calvo, C. Remuñan-López, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, “Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines,” *Pharm. Res.*, vol. 14, no. 10, pp. 1431–1436, 1997.
- [34] L. Rimondini, N. Nicoli-Aldini, M. Fini, G. Guzzardella, M. Tschon, and R. Giardino, “In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer,” *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 99, no. 2, pp. 148–154, 2005.

- [35] S. S. Liao, F. Z. Cui, W. Zhang, and Q. L. Feng, "Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 69, no. 2, pp. 158–165, 2004.
- [36] T. Kaito *et al.*, "Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA–PEG/hydroxyapatite composite," *Biomaterials*, vol. 26, no. 1, pp. 73–79, 2005.
- [37] D. Rosenzweig, E. Carelli, T. Steffen, P. Jarzem, and L. Haglund, "3D-printed ABS and PLA scaffolds for cartilage and nucleus pulposus tissue regeneration," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 7, pp. 15118–15135, 2015.