



---

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## Tesis

Evaluación de marcadores osteogénicos en el proceso de diferenciación de preosteoblastos de ratón (MC3T3) durante la interacción con biomateriales de poliuretano/hidroxiapatita

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
M A E S T R A EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Ingeniera Bioquímica  
TANIA SALUÉN GAYTÁN COMPEÁN

Dirección de tesis:

Doctora en Ciencias Biológicas  
ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA



Morelia, Michoacán  
México  
Agosto 2015



El siguiente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular Humana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” y el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la tutoría de la D. en C.B. Ana Edith Higuera Mendoza. El trabajo se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca otorgada para estudios de Maestría y al apoyo aprobado en el marco de la convocatoria PROMEP 2012 para Redes, dentro del proyecto "SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN BIOMATERIAL POLÍMERO-HIDROXIAPATITA, UNA OPCIÓN PARA IMPLANTES ÓSEOS" de la RED DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES APLICABLES A LA BIOINGENIERÍA.

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, aprobó la memoria de tesis que presentó:

Ingeniera Bioquímica

TANIA SALUÉN GAYTÁN COMPEÁN

Doctora en Ciencias (Biología)

Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

---

Doctor en Investigación Biomédica Básica

Marco Aurelio Pardo Galván

---

Doctor en Ciencias (Biología Celular)

Carlos Cortés Penagos

---

Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Sergio Gutiérrez Castellanos

---

Dirección de tesis

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Edith Higareda Mendoza

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Colaboración

Doctor en Investigación Biomédica Básica

Marco Aurelio Pardo Galván

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencia de Materiales

Georgina Carbajal De la Torre

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias de Materiales

Ana Beatriz Martínez Valencia

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Recibió beca del CONACyT

durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud

Registro de becaria: 286555

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

Laboratorio de Biología Celular Humana

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Laboratorio de Biología Molecular

Morelia, Michoacán

Todos los nombres propios de programas, reactivos, equipo de laboratorio, empresas y documentos que aparecen en este trabajo son marcas registradas de sus respectivas compañías u organizaciones.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A todos los que hicieron posible este proyecto y me han acompañado, brindado su apoyo y tiempo  
en este recorrido:*

*Asesores, profesores y compañeros*

*A mis padres*

*A mis hermanos y tía*

*A Cristian.*

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Marco teórico</b>	4
2.1 Estructura y constitución ósea	4
2.2 Remodelamiento óseo	7
2.3 Diferenciación osteoblástica y sus marcadores	13
2.4 Fisiopatología ósea	16
2.5 Regeneración ósea	17
2.6 Regeneración ósea guiada y el uso de biomateriales	18
2.7 Antecedentes	25
<b>3. Justificación</b>	31
<b>4. Hipótesis</b>	31
<b>5. Objetivos</b>	32
5.1 Objetivo general	32
5.1.1 Objetivos específicos	32
<b>6. Materiales y métodos</b>	33
6.1 Material a evaluar	33
6.2 Modelo celular	33
6.3 Análisis biológicos	34
6.3.1 Preparación del biomaterial	34
6.3.2 Cultivos celulares	34
6.3.3 Ensayos de proliferación, viabilidad y citotoxicidad	36
6.3.3.1 Azul de tripano para medir la concentración y viabilidad celular	36
6.3.3.2 Ensayo Azul de Alamar para medir la viabilidad/citotoxicidad y proliferación celular	38
6.3.4 Grado de mineralización ósea	40
6.3.4.1 Tinción histoquímica con rojo de alizarina S	40
6.3.5 Evaluación de marcadores de osteogénesis por RT-PCR	41
6.3.5.1 Extracción de ARN	41
6.3.5.2 Síntesis de ADNc	43
6.3.5.3 Amplificación de genes por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	44
6.3.5.3.1 Análisis de productos de PCR por electroforesis	46
6.3.5.3.2 Análisis de productos de PCR por espectrofotometría y tinción con Azul de Toluidina	46
6.3.6 Análisis de la superficie del biomaterial por microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS)	49
6.3.6.1 Preparación del biomaterial para el microscopio electrónico de barrido	49

6.3.6.2	Análisis por EDS	50
6.3.7	Análisis estadístico	51
<b>7.</b>	<b>Resultados</b>	<b>52</b>
7.1	Evaluación de los efectos inhibitorios sobre la proliferación celular de las células MC3T3-E1 de los compositos de PU/nHAP	52
7.1.1	Cinética de crecimiento de la línea celular MC3T3-E1 subclona 4	52
7.1.2	Proliferación y viabilidad celular en contacto con el biomaterial a distintas composiciones	53
7.1.3	Evaluación de la viabilidad/citotoxicidad por medio del ensayo de Azul de Alamar	54
7.2	Evaluación del grado de mineralización ósea sobre cada composito	56
7.2.1	Evaluación por tinción histoquímica con rojo de Alizarina S	56
7.3	Evaluación por espectroscopía de energía dispersiva (EDS) de la adherencia, proliferación celular y del grado de mineralización ósea	59
7.4	Evaluación de los marcadores osteogénicos	63
7.4.1	Diseño de primers	63
7.4.2	Evaluación de marcadores osteogénicos por PCR y electroforesis	64
7.4.3	Evaluación de los marcadores osteogénicos por PCR y tinción con Azul de Toluidina (TBO)	72
<b>8.</b>	<b>Discusión</b>	<b>75</b>
<b>9.</b>	<b>Resumen de resultados</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>85</b>
<b>11.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>86</b>
<b>12.</b>	<b>Anexo: Glosario de abreviaturas</b>	<b>91</b>

## RELACIÓN DE TABLAS

Cuadro	Título	Página
1	Porcentaje de inhibición en el crecimiento celular de los distintos biomateriales respecto al control	56
2	Cebadores específicos para los marcadores osteogénicos a evaluar	64

## RELACIÓN DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Curva de referencia para cuantificar la concentración de ADN por el ensayo TBO	48
2	Cinética de crecimiento de la línea celular MC3T3-E1 subclona 4	52
3	Proliferación celular en presencia del biomaterial a distintas composiciones	54
4	Viabilidad celular expresada como el porcentaje de células viables respecto al control del día 1 (células sin biomaterial)	55
5	Grado de mineralización ósea relativa (muestra/control) de los cultivos en presencia del biomaterial a los 11 días, con y sin inducción a la diferenciación celular por ácido ascórbico	58
6	Grado de mineralización ósea relativa (muestra/control) a los 22 días, con y sin de inducción de la diferenciación celular por ácido ascórbico.	59
7	Micrografías del MEB del biomaterial en ausencia de células, 1000X	61
8	Micrografías del MEB del biomaterial al 5% de nHAp con células al día 10 en presencia de ácido ascórbico	61
9	Micrografías del MEB del biomaterial al 10% de nHAp con células al día 10 en presencia de ácido ascórbico	62
10	Micrografías del MEB del biomaterial al 20% de nHAp con células al día 10 en presencia de ácido ascórbico	62
11	Análisis EDS del biomaterial	63
12	PCR's de punto final utilizadas para ajustar ciclos para PCR semi-cuantitativa	66
13	Ajuste de ciclos de GAPDH para PCR semi-cuantitativa	67
14	Ajuste de ciclos para PCR semi-cuantitativa	67
15	Expresión relativa de la Osteocalcina (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo) en cultivos control (sin biomaterial).	69
16	Expresión relativa del Colágeno tipo I (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo) en cultivos control (sin biomaterial).	69
17	Expresión relativa de Osterix (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo) en cultivos control (sin biomaterial).	69
18	Expresión relativa de Osteocalcina a GAPDH (veces de aumento respecto al cultivo control (sin biomaterial y en medio osteogénico) en cultivos celulares en contacto con el biomaterial.	71
19	Expresión relativa de Colágeno tipo I a GAPDH (veces de aumento respecto al cultivo control (sin biomaterial y en medio osteogénico) en cultivos celulares en contacto con el biomaterial.	71
20	Expresión relativa de Osterix a GAPDH (veces de aumento respecto al cultivo control (sin biomaterial y en medio osteogénico) en cultivos celulares en contacto con el biomaterial.	72
21	Expresión relativa de Colágeno tipo I (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo).	73
22	Expresión relativa de Osterix (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo).	74

## RELACIÓN DE ANEXOS

	Página
Glosario de abreviaturas	92



## Evaluación de marcadores osteogénicos en el proceso de diferenciación de preosteoblastos de ratón (MC3T3) durante la interacción con biomateriales de poliuretano/hidroxiapatita

En el ser humano la capacidad regenerativa de los tejidos es limitada, por tanto existen daños estructurales óseos por los cuales es propicio idear terapéuticas que promuevan la regeneración. Los materiales empleados actualmente como injertos óseos tienen como fin principal el reemplazo del hueso para cumplir una función de soporte, no así la regeneración del tejido. Los más comunes son los implantes orgánicos, poliméricos y metálicos, cada uno con ventajas y desventajas; entre estas últimas, la principal es que la mayoría no son biocompatibles ni reabsorbibles, llegando a generar una respuesta inmunológica de rechazo en el organismo. La bioingeniería de tejidos tiene como reto el desarrollo de sustitutos óseos que, además de fungir como soporte, favorezcan la regeneración ósea; para ello, el material deberá promover la adhesión, proliferación y diferenciación celular, tener una función temporal, reabsorberse y sustituirse progresivamente por tejido óseo neoformado. Para este fin, en este proyecto se planteó el uso del híbrido poliuretano/nanohidroxiapatita (PU/nHAp). **Objetivo:** Determinar *in vitro* la composición óptima del híbrido PU/nHAp que presente el mejor estímulo de diferenciación celular y mineralización ósea. **Metodología:** Se evaluó el biomaterial híbrido de PU/nHAp con composiciones de nHAp del 5, 10 y 20%. Como modelo se utilizó la línea celular de preosteoblastos de ratón (*Mus musculus*) MC3T3-E1 subclona 4. Para la evaluación de la proliferación y viabilidad celular se utilizó el ensayo de azul tripano y azul de Alamar. Se hizo un análisis de superficie del biomaterial por microscopía electrónica de barrido y por medio del análisis de composición elemental por espectrometría de dispersión de energía (EDS); se evaluó el grado de adhesión, proliferación y diferenciación celular. Se midió el grado de mineralización por tinción histoquímica con rojo de alizarina S y por EDS. Se evaluó la expresión de marcadores osteogénicos por RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Resultados:** Ninguno de los biomateriales PU/nHAp es citotóxico y tampoco presentan efectos inhibitorios en el crecimiento celular. La viabilidad celular y el grado de mineralización sobre los biomateriales evaluados están ligados directamente al porcentaje de nHAp en la composición de estos. Las micrografías en el MEB y el análisis de composición por EDS demuestran que hubo adhesión y proliferación celular sobre los compositos evaluados y estos podrían estar vinculados directamente al porcentaje de nHAp del biomaterial. Los datos sugieren que el composito PU/20%nHAp podría ser el que estimula en mayor grado el proceso osteogénico. En la evaluación de la expresión génica de osteocalcina, osterix y colágeno tipo I, en cultivos celulares sin presencia de los biomateriales, se pudo observar un perfil de expresión a lo largo del tiempo congruente a algunas referencias de estudios previos con estos genes; en los cultivos en contacto con los biomateriales, se pudo evidenciar la capacidad osteoinductiva y la bioactividad de los biomateriales PU/nHAp, sin la necesidad de un estímulo osteogénico externo. **Conclusiones:** Se confirma la hipótesis de trabajo: Los biomateriales compuestos de poliuretano y nanohidroxiapatita, con composiciones al 20% en peso de hidroxiapatita y menores, estimulan la diferenciación celular y la mineralización de tejido óseo neoformado.

Palabras clave: Marcadores osteogénicos, Biomateriales, Diferenciación celular, Osteogénesis, Expresión génica.



## Evaluation of osteogenic markers in the differentiation of murine preosteoblasts (MC3T3) during the interaction with polyurethane/hydroxyapatite biomaterials

In humans the regenerative capacity of tissues is limited; consequently, there are bone structural damages for which it is appropriate to devise therapeutics that promote regeneration. The materials used currently as bone grafts have the main purpose of replacing the bone to fulfill a support function and not for tissue regeneration. The most common are organic, polymeric and metallic implants, each with advantages and disadvantages; among the latter, the main thing is that most are not biocompatible and resorbable, generating an immune rejection response in the body. Tissue bioengineering has the challenge of developing bone substitutes that, besides serving as a support, promote bone regeneration; for this, the material must promote cell adhesion, proliferation and differentiation, have a temporary function, and gradually be resorbed and replaced by newly formed bone tissue. For this purpose, the use of polyurethane/ nano-hydroxyapatite hybrids (PU/nHAp) was proposed in this project. **Objective:** To determine *in vitro* the optimal composition of the PU/nHAp hybrid that presents the best cell differentiation and bone mineralization stimulus. **Methodology:** PU/nHAp hybrid with compositions of 5, 10, and 20 weight % nHAp were evaluated. A murine preosteoblast cell line, MC3T3-E1 subclone 4, was used as the cellular model. To evaluate cell proliferation and viability, Trypan Blue and Alamar Blue assays were used. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive Spectrometry (EDS) were used to analyze, respectively, the surface and the elemental composition of biomaterial samples; the degree of cell adhesion, proliferation, and differentiation was assessed with SEM and EDS data. The extent of mineralization was measured by histochemical staining with Alizarin red S and with EDS data. Expression of osteogenic markers was evaluated by RT-PCR and gel electrophoresis in 1% agarose. **Results:** None of the PU/nHAp biomaterials are cytotoxic, and neither have inhibitory effects on cell growth. Cell viability and the degree of mineralization are directly linked to the percentage of nHAp in the biomaterial composition. The SEM micrographs and EDS composition analysis showed cell adhesion and proliferation on the surface of biomaterials, and that this may also be linked directly to the percentage of nHAp in the biomaterial. The data suggests that the PU/20%nHAp composite might stimulate the osteogenic process in a greater degree, compared to the other composites tested. In control cultures, MC3T3-E1 in osteogenic medium and without the presence of biomaterials, the obtained osteocalcin, osterix and type I collagen gene expression profiles agree with previous reports using these genes as osteogenic markers; in cell cultures contacting biomaterials, the osteoinductive capability and bioactivity of PU/nHAp biomaterials was evident, without the need for an external osteogenic stimulus. **Conclusions:** The working hypothesis is confirmed: Biomaterials compounds of polyurethane and nano-hydroxyapatite, with compositions 20 weight % or lower of hydroxyapatite, stimulate cell differentiation and mineralization of newly formed bone tissue.

Keywords: Osteogenic markers, biomaterials, cell differentiation, osteogenesis, gene expression.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los huesos como parte del esqueleto humano, mantienen funciones fundamentales en nuestro organismo, tales como el soporte y movilidad del cuerpo, la protección de órganos vitales, alberga a la médula ósea hematopoyética, además de ser un reservorio de iones de calcio y fósforo principalmente. A lo largo de la vida de todo mamífero, el hueso se encuentra en un proceso constante de remodelamiento óseo, proceso cuya función es la reparación del tejido y mantener en equilibrio el volumen óseo, éste consiste en dos sucesos acoplados, la resorción o eliminación del tejido óseo dañado, viejo o acumulado y, la formación de nuevo tejido óseo en el mismo lugar de la resorción. El equilibrio entre la resorción y la formación óseas estará influido por factores genéticos, hormonales, mecánicos, vasculares, nutricionales y/o locales, la edad también es un factor importante, ya que normalmente, este balance se mantiene hasta aproximadamente la tercer década de la vida humana, a partir de ese momento, la resorción ósea será mayor a la formación de nuevo tejido, situación que con el paso de los años, tenderá a disminuir la densidad ósea en mayor o menor grado; una baja densidad ósea podría llevar a la osteoporosis o a una vulnerabilidad potencial a las fracturas. La pérdida de tejido óseo, también puede ser causa de otras circunstancias, como traumas, resecciones amplias por tumores o enfermedades por ejemplo. Ante el daño del tejido óseo, de manera natural, el organismo echará a andar un mecanismo de regeneración ósea, que puede llegar con éxito a una sanación total del tejido, sin embargo, cuando este proceso de consolidación se ve alterado por diversos factores (mecánicos, biológicos o ambos) o ante grandes defectos o resecciones óseas, todo esfuerzo de regeneración podría ser inútil y llevar finalmente a una pérdida irreversible de tejido óseo.

El tratamiento más adecuado al día de hoy para sustituir la carencia o ausencia de hueso, son los injertos óseos. Antaño, el objetivo de estos era que cumplieran con una función de sostén, así los más

utilizados, aún hoy en día, son del tipo metálico, como aleaciones de titanio y aceros inoxidable, los cuales, entre las desventajas que presentan son una probable respuesta inmune desfavorable del huésped, así como el requerimiento de segundas cirugías. Se han utilizado también autoinjertos, los cuales son considerados el injerto ideal, sin embargo, presentan la limitación de su disponibilidad; los aloinjertos y xenoinjertos han sido segundas opciones, con la desventaja del riesgo potencial de infecciones y una respuesta inmune desfavorable del huésped en muchas ocasiones. Es por ello que, en años más recientes, se ha visto como opción viable el uso de materiales sintéticos como sustitutos óseos, los más estudiados han sido del tipo metálico, cerámico y polimérico, cada uno con ventajas y desventajas intrínsecas a las características propias de cada material.

Hoy en día, la ingeniería en tejidos, tiene por objetivo desarrollar materiales como sustituto óseo que además de fungir inicialmente como soporte y reemplazo del tejido u órgano afectado, induzca la adhesión de células osteoprogenitoras, su proliferación, diferenciación y subsecuente formación de nuevo tejido óseo sobre estos materiales. Se busca que estos materiales, además sean biocompatibles y biodegradables a una tasa similar a la tasa de formación ósea, para que éste se degrade en el organismo a medida que de paso a la formación de nuevo tejido óseo y que finalmente, el material quede sustituido en su totalidad por nuevo hueso. Para cumplir con la función de regeneración ósea, además de las características antes mencionadas, estos materiales deberán poseer propiedades mecánicas y físicas similares al tejido que reemplazan, deberán tener un tamaño de poro y porosidad adecuada para permitir la entrada de las células, el crecimiento de matriz osteoide y finalmente la vascularización del nuevo tejido.

Esta nueva generación de materiales con fines regenerativos, reciben el nombre de biomateriales. Los utilizados a la fecha, presentan ventajas y desventajas por sí solos, por lo que alrededor del mundo han surgido nuevas propuestas, los cuales combinan una parte metálica y otra cerámica, o una parte

cerámica y otra polimérica, por citar algunos ejemplos. Estas nuevas propuestas en su diseño han aprovechado las propiedades intrínsecas de cada uno, apostando por una mejora en sus propiedades osteo-regenerativas al combinar ambos compuestos. La mayoría de estos biomateriales compuestos aún se encuentran en estudio, en el largo recorrido de validación para su uso como sustituto óseo humano.

Diversos estudios han investigado sobre la síntesis y caracterización de materiales híbridos de hidroxiapatita (HAp) y polímeros, sin embargo, todavía hay muchas preguntas en el área de los biomateriales compuestos y hay aún mucho trabajo por hacer para entender el comportamiento celular con los compuestos HAp/polímero.

En la búsqueda de un biomaterial idóneo para la regeneración ósea, en este proyecto se trabaja con la propuesta de Martínez y col. (2011), quienes en su trabajo diseñaron y caracterizaron un composito formado por poliuretano (PU) y nano-hidroxiapatita (nHAp) en distintas proporciones, y dadas las propiedades determinadas en éstos, consideraron que podrían ser una opción viable como sustituto óseo humano, razón por la cual en este proyecto se lleva a cabo la evaluación biológica de varios compositos de PU/nHAp con el objetivo de determinar el de aquella composición que estimule en mayor grado el proceso osteogénico. Para ello, se lleva a cabo la evaluación biológica *in vitro* de los distintos compositos al contacto con células osteoblasticas MC3T3-E1, y mediante la evaluación de marcadores osteogénicos se pretende dilucidar el objetivo.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Estructura y constitución ósea

El hueso es el principal componente del esqueleto que cumple con funciones fundamentales, tales como dar soporte al cuerpo y posibilitar la acción mecánica de la musculatura, proteger órganos vitales internos a los cuales delimita, albergar la médula ósea hematopoyética y cumple también con una función metabólica como reserva de iones, principalmente calcio (Ca) y fósforo (P).

Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra médula ósea. Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y una fase mineral (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

La matriz orgánica, también llamada sustancia osteoide o matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés, *extracellular matrix*) representa un tercio del peso óseo. Está conformada principalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%); principalmente del tipo I (>95%), tipo V (<5%) y pequeñas proporciones de colágeno tipo III y tipo XII (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a). El colágeno proporciona resistencia, estabilidad estructural, y la organización de la matriz (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b). La otra porción restante está representada por proteínas no colágenas (proteoglicanos, proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, glicoproteínas, proteínas procedentes del plasma y factores de crecimiento) que se expresan durante la osteogénesis, crecimiento y

diferenciación celular (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a). Durante la formación de hueso, las células primero establecen una matriz de colágeno, compuesto principalmente de colágeno tipo I. Después que se ha formado esta red de colágeno, las proteínas no colágenas se unen a la matriz y entonces la matriz mineralizada es utilizada para formar hueso (Bernards *et al.*, 2008).

La matriz inorgánica o mineral representa el 65% del peso óseo. Está formada por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  y, en menor proporción, por sodio, potasio, manganeso y flúor (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

Las células que alberga el tejido óseo son de varios tipos y están alojadas dentro del propio tejido óseo o en el estroma de la médula ósea, que es rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

Tres tipos de células son de principal importancia en el tejido óseo:

**El osteoblasto.** Son células grandes (20-30  $\mu\text{m}$ ), mononucleadas, de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a). Los osteoblastos se derivan de las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés, *mesenchymal stem cell*) las cuales se encuentran en la médula ósea. Los osteoblastos se encuentran en la superficie del hueso, expresan receptores de múltiples hormonas y diversas moléculas de superficie celular, y secretan hormonas y enzimas que mantienen el equilibrio entre la formación y resorción ósea, además, inician el proceso de mineralización (Tsai *et al.*, 2012). Sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3

$\mu\text{m}$  por día y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2  $\mu\text{m}$  por día. Además, sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, que dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, que contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide gracias a la fosfatasa alcalina, que participan en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citocinas específicas, y que sintetizan factores de crecimiento (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

**El osteocito.** Son células que se forman a partir de la diferenciación de los osteoblastos. Una vez mineralizada la matriz osteoide, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro de la matriz, transformándose en osteocitos. Es así que, los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Son las células más abundantes del hueso. Participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a). Están en comunicación entre sí a través de múltiples prolongaciones de la membrana y de los canales de Volkmann y Havers; este entramado es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis ósea.

**El osteoclasto.** Es una célula gigante multinucleada (100 $\mu\text{m}$ ) y móvil, que degrada, reabsorbe y remodela huesos. Al igual que el osteoblasto, está implicado en la remodelación de hueso natural. Proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM, por sus siglas en inglés, *granulocyte macrophage progenitor-granulocyte, monocyte*), las cuales son precursoras de macrófagos y monocitos (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a). Ocupan una cavidad llamada laguna de resorción o laguna de Howship y se localizan en las superficies óseas asociadas a la matriz ósea. Los osteoclastos se forman

por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea de la médula ósea; una vez realizada su función, desaparecen, transformándose en células mononucleares.

## 2.2 Remodelamiento óseo

El tejido esquelético se expone a fuerzas mecánicas a lo largo de todo el período de vida de los vertebrados, y la masa ósea se ajusta en respuesta, ya sea con la absorción de material esquelético existente o la síntesis de hueso nuevo en un sitio específico (Kirkham y Cartmell, 2007).

Una correcta salud ósea es indispensable para que el esqueleto pueda cumplir con sus tres funciones fundamentales: mecánica, como soporte del cuerpo; protectora de los órganos internos que delimita; y metabólica como reserva de iones, principalmente de calcio (Ca) y fósforo (P). Para ello, el esqueleto cuenta con la habilidad de renovarse continuamente mediante el proceso de remodelamiento óseo (del inglés *turnover*) (Reynaga y Zeni, 2009), lo cual hace un tejido dinámico en constante formación y reabsorción, que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b). Este fenómeno equilibrado comienza tempranamente, en el útero, y continúa hasta la muerte del individuo) (Reynaga y Zeni, 2009), teniendo un balance positivo hasta la tercera década, que es cuando existe la máxima masa ósea, que se mantiene con pequeñas variaciones hasta los 50 años. A partir de aquí, existe un predominio de la reabsorción y la masa ósea empieza a disminuir (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b). El proceso de remodelado permite la renovación de un 5% del hueso cortical y un 20 % del trabecular al año (un 5-10% del hueso total al año) (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

El remodelamiento óseo no es más que el reemplazo periódico de hueso viejo y dañado por hueso nuevo, en el mismo sitio, reparando el daño por fatiga del material que pudiera producirse por la

acumulación de mineral. Este proceso es el responsable de la completa regeneración del esqueleto adulto cada 10 años (Reynaga y Zeni, 2009).

El recambio óseo comprende dos etapas: resorción y formación ósea que son llevadas a cabo por el esfuerzo colaborativo y secuencial de un grupo de células que se encuentran dentro de una estructura temporaria denominada "unidad de remodelamiento óseo" (URO) (Reynaga y Zeni, 2009), que son pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, conocidas también como unidades básicas multicelulares o BMU (por sus siglas en inglés, *basic multicellular units*) (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b). Es decir, la resorción del hueso viejo y su reemplazo por hueso nuevo es producto de la acción principal de dos tipos celulares diferentes: osteoclastos y osteoblastos que, a pesar de no encontrarse separados, son independientes (Reynaga y Zeni, 2009). La reabsorción siempre precede a la formación y, en el esqueleto joven, las cantidades de hueso reabsorbidas son similares a las neoformadas. Por esto se dice que es un proceso balanceado, acoplado en condiciones normales, tanto en el espacio como en el tiempo (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

El remodelamiento es un proceso cíclico que comienza con el hueso en estado de reposo y culmina de igual manera. En todo el esqueleto y en un período de tiempo dado, millones de estas UROs se encuentran operando en diferentes estadios del ciclo. Cada URO permanece inactiva aproximadamente de 6 a 8 meses, aunque continúa acumulándose mineral con lo cual el hueso se endurece y pierde elasticidad (Reynaga y Zeni, 2009). Las alteraciones biomecánicas producidas por este envejecimiento hacen que comiencen a producirse "microfracturas" las que, por una señal no del todo clara, son detectadas por células inmersas en la matriz mineralizada. Estas células liberan factores hacia la superficie ósea desencadenando el inicio del ciclo de remodelamiento en el que se evidencian 4 fases: activación, resorción, reversión y formación (Reynaga y Zeni, 2009).

### **Fase de activación:**

La activación produce la atracción, desde la circulación, de precursores osteoclásticos mononucleares (provenientes de progenitores hematopoyéticos) cuya diferenciación celular a preosteoclastos multinucleados es señalizada por citocinas provenientes de las células en reposo que tapizan la superficie ósea y otras células del mesénquima. Los preosteoclastos se pegan a la superficie a resorber mediante receptores de integrinas presentes en sus membranas y que tienen la particularidad de unirse a determinados péptidos presentes en la matriz extracelular que contienen la secuencia arginina-glicina-aspártico (RGD). Dicha unión delimita un compartimento denominado "laguna de resorción" y desencadena la polarización del osteoclasto que emite prolongaciones citoplasmáticas llamadas "ribete en cepillo" a través de las cuales volcará sus productos iniciando la siguiente fase denominada de resorción propiamente dicha (Reynaga y Zeni, 2009).

### **Fase de resorción:**

Durante la fase resorptiva una bomba de protones (H<sup>+</sup>) específica y otros canales iónicos presentes en la membrana del ribete en cepillo del osteoclasto producen una disminución considerable del pH en la laguna de resorción. Esta acidificación es acompañada por la secreción de una serie de enzimas lisosomales tales como fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP, por sus siglas en inglés, *Tartrate-resistant acid phosphatase*) y catepsina K, así como metaloproteasas de la matriz (MMP, por sus siglas en inglés, *matrix metalloproteinases*) entre las que se encuentran colagenasas como la MMP-9. La disminución del pH en forma conjunta con la liberación de enzimas, que presentan actividad máxima a pH ácidos, produce la degradación del cristal de hidroxiapatita y en forma subsiguiente la del colágeno creando cavidades denominadas "lagunas de Howship" en el hueso trabecular y túneles cilíndricos en el hueso cortical. La resorción es un proceso rápido que dura aproximadamente de 10 a

12 días, finaliza con la apoptosis del osteoclasto y es seguida por la fase reversa (Reynaga y Zeni, 2009).

### **Fase reversa:**

Durante la etapa de *reversión* la laguna de resorción es reemplazada por monocitos y osteocitos, que fueron liberados de la matriz mineralizada durante la resorción, y por preosteoblastos que fueron reclutados para comenzar a formar nuevo hueso. En esta etapa es donde se producen las señales de acoplamiento más importantes y aunque, hasta el momento, la naturaleza exacta de dichas señales es desconocida existen una serie de hipótesis respecto a ello. Una sugiere que, durante la resorción, los osteoclastos liberarían ciertos factores de crecimiento que habían quedado inmersos en la matriz ósea mineralizada, los que actuarían como factores quimiotácticos osteoblásticos estimulando su proliferación y diferenciación. Alguno de los candidatos potenciales sugeridos son el factor de crecimiento tumoral beta (TGF $\beta$ , por sus siglas en inglés, *transforming growth factor beta*), el factor de crecimiento insulínico I y II (IGF I y II, por sus siglas en inglés, *insulin-like growth factor*), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs, por sus siglas en inglés, *bone morphogenetic proteins*), el factor de crecimiento y diferenciación plaquetario (PDGF, por sus siglas en inglés, *platelet-derived growth factor*) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF, por sus siglas en inglés, *fibroblast growth factor*). Entre todos ellos el principal candidato es el TGF $\beta$ , ya que diversos estudios demostraron que prolonga la vida media de los osteoblastos inhibiendo su apoptosis, a la vez que inhibe la producción por dichas células de otros factores que aumentan la resorción.

Otra de las teorías sugeridas es que el propio osteoclasto jugaría un rol en el acoplamiento donde estarían implicadas señales bidireccionales entre osteoblastos y osteoclastos, vía receptores de efrina.

En el adulto, y debido al proceso de acoplamiento, los osteoblastos son atraídos al lugar donde se generó previamente la resorción. Esta etapa es la menos conocida de todo el ciclo de remodelamiento, no se observa durante el crecimiento, por ello se denomina de “modelamiento”. A diferencia del remodelamiento, el modelamiento no se encuentra acoplado en el sentido de que la formación puede producirse donde previamente no existió resorción, siendo así el responsable del crecimiento del largo y ancho de los huesos (Reynaga y Zeni, 2009).

### **Fase de formación:**

La formación comprende dos etapas en las que los osteoblastos sintetizan primeramente la matriz del osteoide y luego regulan su mineralización. Los osteoblastos provienen de progenitores mesenquimáticos que pueden proliferar y diferenciarse a precursores osteoblásticos, preosteoblastos y osteoblastos maduros. A diferencia del osteoclasto que llega al hueso desde la circulación, los precursores osteoblásticos mayoritariamente lo alcanzan por migración de progenitores desde los tejidos conectivos circundantes. Cuando el hueso está inactivo los osteoblastos se encuentran sobre la superficie ósea y se les denomina células en reposo. Estas células presentan una forma alargada, plana que se modifica hacia una forma cúbica cuando existe formación activa. Dentro de la cavidad de resorción los osteoblastos primeramente forman una capa sintetizando proteínas de la matriz, principalmente colágeno tipo I y otras proteínas no colágenas (osteocalcina, osteonectina, factores de crecimiento, citocinas, etc.), todas ellas importantes para el proceso de mineralización. A continuación se incorporan factores locales y citocinas produciendo la maduración del osteoide. Sobre las fibras de colágeno maduro comienza el proceso de *calcificación* correspondiente a la incorporación de cristales de hidroxiapatita. Todos estos procesos determinan que, a diferencia de la resorción, la formación sea más lenta (3 meses) (Reynaga y Zeni, 2009).

Los osteoblastos desencadenan la mineralización liberando pequeñas vesículas pegadas a su membrana denominadas vesículas matriciales, que establecen condiciones óptimas para iniciar la deposición de mineral. Dichas vesículas concentran iones calcio y fosfato y enzimas que degradan a los inhibidores de la mineralización como pirofosfatos y proteoglicanos presentes en la matriz extracelular. A medida que la mineralización continúa, los osteoblastos quedan inmersos en la matriz y cambian su morfología transformándose en osteocitos. Es decir, que al cumplir su función, sólo aproximadamente el 20% de los osteoblastos muere por apoptosis, el resto queda inmerso dentro de la matriz mineralizada que ellos mismos produjeron transformándose en osteocitos. Estas células no proliferativas corresponden al último estadio de diferenciación de las células del linaje osteoblástico, son relativamente inertes metabólicamente y como se ubican dentro de lagunas osteocíticas rodeadas de un tejido mineralizado duro pierden su capacidad migratoria (Reynaga y Zeni, 2009).

Los osteocitos han tomado un interés creciente en los últimos años ya que se ha descubierto que participan activamente en la regulación homeostática del remodelamiento óseo. Estas células se caracterizan por tener una morfología estrellada que recuerda la trama dendrítica del sistema nervioso. Son las células más abundantes del hueso (10 osteocitos por cada osteoblasto) y se comunican entre sí o con células de la superficie ósea mediante múltiples extensiones de sus membranas citoplasmáticas. Mediante estas proyecciones forman un sincitio celular estratégico de redes de conexión (uniones "gap") que representarían un sistema muy eficiente en la transmisión metabólica de señales a través de enormes distancias. Su localización las transforma en excelentes células mecanosensoras capaces de detectar señales de "estrés mecánico", las que traducen en señales químicas (citocinas) que son enviadas a la superficie iniciando así el proceso del remodelado óseo. El osteocito se polariza en el sentido de que sus prolongaciones son más numerosas hacia la superficie del hueso para conectarse con células en reposo y/o con osteoblastos. Los osteocitos también participan en la finalización del proceso de formación ya que secretan una citocina

denominada esclerostina que tiene la particularidad de suprimir la función osteoblástica (Reynaga y Zeni, 2009).

A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a los 90 días en el trabecular (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

Algunas fuentes agregan una fase previa a la fase de activación en el proceso de remodelamiento óseo, llamada fase quiescente, en la cual el hueso se encuentra en condiciones de reposo. Una vez finalizada la fase de mineralización, de nuevo empieza el ciclo con la fase quiescente o de descanso (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

Dada la naturaleza de este proyecto, la etapa de especial interés para éste es la de formación ósea.

### **2.3 Diferenciación osteoblástica y sus marcadores**

Actualmente se sabe que la diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: *Ihh* (Indian hedgehog) y *Shh* (Sonic hedgehog). También es esencial el factor de transcripción *Cbfa1* (core-binding factor alpha-1, también llamado *Runx2*) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs, por sus siglas en inglés), que constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales pluripotenciales (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

Las principales fases involucradas en el proceso de diferenciación osteoblástica son el periodo de proliferación, la deposición de la matriz extracelular, su maduración y subsecuente mineralización (Angwarawong *et al.*, 2011).

A medida que las células precursoras se van diferenciando, expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. Se han reportado varios genes que son regulados o altamente expresados en ciertas etapas de la diferenciación de osteoblastos y que podría ser utilizados como los marcadores específicos en cada etapa de diferenciación.

Fernández-Tresguerres y col. (2006b) consideran que la expresión de Cbfa1 (Runx2) es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica, cuyo máximo nivel se alcanza en los preosteoblastos. El colágeno tipo I y la osteopontina (OPN) se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente, la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del preosteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización ósea. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica.

Angwarawong y col. (2011) mencionan que el colágeno tipo I y la fosfatasa alcalina son altamente expresados cerca del final del período de proliferación y durante el período de deposición y maduración de la matriz extracelular, mientras que OPN, BSP y OCN se expresan altamente en o cerca del momento de la mineralización.

De nuestro especial interés en el proceso de osteogénesis son los siguientes marcadores:

**Osterix (OTX).** Es uno de los pocos genes caracterizados específicos de osteoblastos. El homólogo humano es el gen Sp7. La presencia de OTX es vital para el desarrollo del esqueleto maduro en el desarrollo fetal. Se cree que OTX actúa en la regulación de numerosos genes osteoblásticos que

incluyen: osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea y colágeno tipo I. El gen también puede actuar en conjunto con otros reguladores, tales como pNmp4, Aj18, Runx2, y la COX-2, aunque tales interacciones permanecen indefinidas. La eliminación del gen OTX en modelos de ratones resulta en una falta total de osificación (Kirkham y Cartmell, 2007).

**Colágeno tipo I (CTI).** Es la proteína más abundante en la matriz ósea y sirve como base para la mineralización. Por otra parte, es una proteína de la matriz osteoide que juega un papel fundamental en el mantenimiento del fenotipo osteoblástico, haciendo a la matriz competente para la mineralización (Angwarawong *et al.*, 2011; Kirkham y Cartmell, 2007).

**Osteocalcina (OCN)** (proteína Gla o ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico). La osteocalcina (OCN) es el constituyente proteico no colágeno más importante de la matriz ósea con un porcentaje que ronda el 15%. Corresponde a un pequeño péptido de 49 aminoácidos sintetizado por los osteoblastos en los últimos estadios de la formación ósea como una molécula precursora llamada pro-osteocalcina y bajo el control de la vitamina D. Este propéptido contiene tres residuos de ácido glutámico (glu) en las posiciones 17, 21 y 24 que se carboxilan postraslacionalmente a ácido carboxiglutámico (gla) en una reacción dependiente de vitamina K. La fracción propeptídica se elimina de la molécula al mismo tiempo que la proteína carboxilada se vuelca al espacio extracelular donde se une a la hidroxiapatita vía  $\text{Ca}^{++}$  a través de los residuos de gla (Reynaga y Zeni, 2009). Es por ello que, es una proteína de unión que se encuentra comúnmente en la matriz orgánica de los tejidos mineralizados, como el hueso; es altamente expresada en o cerca del momento de la mineralización y ha sido considerado como el marcador de la fase tardía de la diferenciación de osteoblastos (Kirkham y Cartmell, 2007; Tsai *et al.*, 2012).

## 2.4 Fisiopatología ósea

Los cambios de masa ósea se ha asumido que son secundarios a cambios en el balance entre la resorción y formación óseas, procesos generalmente acoplados, con variaciones, a lo largo de la vida; así durante la infancia y adolescencia existe una elevada resorción ósea, pero con una formación de hueso todavía mayor, con el resultado de aumento de la masa esquelética. Esta situación anabólica llega al pico máximo de masa ósea aproximadamente en la tercera década, tras la cual, habitualmente, la resorción del hueso supera la formación, con pérdida progresiva de masa ósea (Lafita, 2003).

Los mecanismos patogénicos que se han implicado en el desarrollo de una baja masa ósea son (Lafita, 2003):

1. Fallo en la consecución de un pico de masa ósea óptimo; aspecto, en parte condicionado genéticamente, sobre el que influyen diversos factores ambientales: estilo de vida, dieta, actividad física, etc. durante la etapa de crecimiento esquelético.
2. Incremento en la resorción ósea. Mecanismo implicado en la mayoría de los pacientes con osteoporosis; con una regulación compleja, en la que influyen citocinas de síntesis local, aspectos hormonales típicos de la edad (déficit de estrógenos, hiperparatiroidismo secundario, etc.), cambios en la respuesta al ejercicio, etc.
3. Formación ósea inadecuada, bien por resorción excesiva, que no permite la formación de nuevo hueso, y al perderse parte de los elementos en la que ésta se sustenta; o bien, por alteración de la regulación osteoblástica por factores locales o sistémicos.

Por su parte Reynaga y Zeni (2009) consideran que el proceso de resorción es más rápido que el de formación, por ello todo aumento en el ciclo de remodelamiento lleva a una pérdida de masa ósea; una pérdida acelerada de masa ósea que si continúa en el tiempo puede conducir a osteoporosis e incremento en el riesgo de fracturas.

La regulación del remodelado óseo se relaciona con factores mecánicos (actividad física y fuerza muscular) y humorales (concentración de  $\text{Ca}^{++}$  y fosfatos, hormonas, vitamina D, citocinas) que actúan sobre la células óseas para el reclutamiento, proliferación y función celular.

Fernández-Tresguerres y col. (2006b) consideran que el balance entre la reabsorción y la formación ósea está influido por una serie de factores interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales.

Por otro lado, tras un trauma y fractura del tejido óseo, el cuerpo echará a andar un proceso de sanación denominado regeneración ósea.

## **2.5 Regeneración ósea**

La regeneración tisular es la respuesta que consigue la *restitutio ad integrum* del tejido tras un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original. En este sentido el hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión.

La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Tras un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina. Las células del coágulo liberan interleucinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de

osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial. Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citocinas. En este proceso va a ser fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

El proceso de consolidación puede ser alterado o perturbado por factores mecánicos, biológicos o una combinación de ambos, que llevarán a una consolidación retardada, o a una pseudoartrosis que es un proceso terminal que implica la formación de una cicatriz fibrosa definitiva e irreversible, y que puede implicar pérdida de tejido óseo (pseudoartrosis atrófica).

Ante grandes resecciones de tejido óseo propiciadas por tumores, enfermedades infecciosas o fracturas (accidentes), todo esfuerzo del cuerpo por regenerar el tejido podría ser insuficiente, lo cual implicará pérdida de parte de la masa original del tejido óseo. Ante esta situación, en el tratamiento de grandes defectos óseos, los injertos son el tratamiento indicado para mejorar o sustituir la carencia de tejido.

## **2.6 Regeneración ósea guiada y el uso de biomateriales**

En un principio, en el enfoque dado a los implantes óseos sólo se buscaba aplicar o desarrollar materiales capaces de soportar los esfuerzos mecánicos que originalmente debía soportar el hueso dañado y que no provocaran una reacción de rechazo por parte del organismo en el que se implantaban. En esta categoría de materiales encontramos metales, como los aceros inoxidables y aleaciones de titanio, en los sistemas de fijación de huesos con fracturas. Sin embargo, estos sistemas tienen el inconveniente de requerir intervenciones quirúrgicas para su extracción luego del

tratamiento, lo que implica mayores costos y el riesgo potencial de una infección. Además, todo material que se inserta en un tejido vivo provoca una respuesta, aunque sea leve, por parte de éste.

Tradicionalmente, el tratamiento ideal para reparar defectos óseos es por el uso de autoinjertos, comúnmente cosechado de la cresta ilíaca. Sin embargo, esto está limitado por la disponibilidad y la morbilidad de las zonas donantes, además el uso de aloinjertos o xenoinjertos se ve obstaculizado por los riesgos potenciales de enfermedades de transmisión y la respuesta inmune del huésped. Por estas razones, el uso de materiales sintéticos como sustitutos de injerto de hueso se ha convertido en una opción viable.

El injerto óseo ideal combina el potencial osteogénico de las células osteoprogenitoras autólogas con un vehículo de entrega tridimensional biocompatible para generar un tejido de reemplazo que es estructural y funcionalmente equivalente al hueso circundante. Estos injertos óseos deberán permitir la adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y en última instancia la deposición de matriz ósea mineralizada.

A la fecha se han descrito numerosos modelos de sustitutos óseos combinando diversos tipos celulares y vehículos de entrega capaces de depositar tejido mineralizado. Algunos autores han intentado mejorar la eficiencia en la osteogénesis alterando el diseño del portador, incorporando directamente a la estructura del andamio diferentes proteínas angiogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras. Otros se han enfocado en la manipulación genética de células osteoprogenitoras para mejorar de manera local la regeneración del tejido óseo. Debido a que las necesidades metabólicas del hueso en desarrollo dependen del éxito de la neovascularización, otros más han examinado el papel que juega la angiogénesis en la regeneración ósea eficaz (Jarrahy *et al.*, 2005).

En la búsqueda de un injerto óseo ideal, ha surgido un nuevo concepto de material como injerto óseo, denominado biomaterial, definido como "un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo" según la *Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials* (Segunda Conferencia para el Consenso de definiciones en Biomateriales, que tuvo lugar en el Reino Unido en 1991 (Gil *et al.*, 2008)).

El factor principal que distingue un biomaterial de otros materiales es su capacidad para existir en contacto con el tejido humano sin causar ningún daño al cuerpo. Los biomateriales se utilizan en campos muy diversos, tales como la ingeniería de tejidos, sensores invasivos, administración de fármacos y sistemas de transfección génica. Uno de los objetivos de la ingeniería de tejidos es reemplazar las funciones de los tejidos comprometidos (Piticescu *et al.*, 2010).

Entre las características a considerar en el diseño de un biomaterial, Angwarawong y col. (2011) consideran que uno de los factores que juegan un papel importante en la determinación de la respuesta celular en la interfase célula-material son las características de la superficie de los biomateriales, tales como la microestructura, la rugosidad de la superficie, el ángulo de contacto (humectación), la energía de superficie, la carga superficial, la topografía, y la química de la superficie. Considera que el efecto de la química de superficie en las interacciones célula-material podría considerarse como efecto secundario. El tipo y la cantidad de proteínas adsorbidas en la superficie pueden actuar como el factor principal que rige las interacciones de la superficie celular. Que la superficie hidrófila e hidrófoba no gobierna directamente la adhesión celular, más bien, la capacidad de las superficies moderadamente humectables en la adsorción de una cantidad apropiada de proteína es la clave para la mejora de las interacciones célula-material. Por lo tanto, la modificación

de las superficies de biomateriales puede mejorar las funciones y actividades celulares, incluyendo la adhesión celular, la proliferación y diferenciación de los osteoblastos.

Davies y col. (2010) también consideran de importancia la topografía y rugosidad de la superficie de un biomaterial, lo cual demuestra en un estudio llevado a cabo, en el que empleando diferentes superficies con distinta topografía y valores de rugosidad incrementados linealmente, demostraron el impacto que tiene la rugosidad en la adhesión, diferenciación y formación de nuevo hueso. Usando como modelo células MC3T3-E1, y a partir de análisis combinados, se demostró la influencia que tiene la topografía de la superficie en la adhesión celular, en este caso las superficies estriadas mostraron aumento en la diferenciación celular comparada con superficies pulidas, y una clara correlación negativa entre el aumento de rugosidad de la superficie y la unión celular. Se mostró que la adhesión celular por arriba de un 50% de confluencia se produce en un estrecho rango de rugosidad ( $R_a$  de  $0.0125 \mu\text{m}$  a  $6.3 \mu\text{m}$ ) en el cual se promueve la diferenciación y formación de hueso. En este estudio se demuestra cómo las características de superficie influyen positivamente o negativamente en la mineralización ósea, indicado por la expresión de osteocalcina en células que se han diferenciado a lo largo de un linaje óseo.

La ingeniería de tejidos propone además como estrategia para tratar los defectos óseos, el uso de andamios o estructuras tridimensionales porosas y biodegradables, que permitan que las células se adhieran y proliferen, creando las condiciones para la formación de matriz extracelular actuando como estructuras de sostén. Los andamios ideales para la regeneración ósea deben promover la mineralización temprana y soportar la nueva formación de hueso (Chen *et al.*, 2012).

Para este propósito, se busca que el biomaterial sea biocompatible, osteoinductivo, osteoconductor y biodegradable, para que no genere una respuesta inmune a corto o largo plazo en la persona,

además de fungir como una matriz de soporte donde las células encuentren el ambiente adecuado para adherirse, proliferar y formar nuevo tejido óseo. Se busca además que, la tasa de formación del nuevo tejido sea similar a la tasa de degradación del implante y que las propiedades del biomaterial sean lo más parecidas posibles a las propiedades del tejido que reemplazarán, por lo cual también deberá poseer propiedades mecánicas similares (resistencia, rigidez y elasticidad) y una porosidad adecuada que favorezca a la vascularización e inervación del nuevo tejido que se está formando.

El tamaño de poro juega un papel importante en el diseño de implantes, puesto que según sea su valor, la regeneración del hueso será directamente afectada; sin embargo, no hay aún un acuerdo sobre el tamaño óptimo que éstos deben tener. Cunningham y col. (2010) consideran que el tamaño de poros necesarios para la completa regeneración ósea deberá ser: 5  $\mu\text{m}$  permiten la nueva vascularización, poros entre 15 y 40  $\mu\text{m}$  permiten el crecimiento de fibroblastos, poros entre 40 y 100  $\mu\text{m}$  favorecen el crecimiento de osteoide (matriz ósea), poros entre 200 y 350  $\mu\text{m}$  permiten un significativo crecimiento de los huesos y poros mayores a 500  $\mu\text{m}$  permiten la rápida vascularización. Otros autores le dan mayor importancia a la interconectividad entre los poros, así por ejemplo Bohner y Baumgart (2004) consideran que el crecimiento del hueso no debe ser afectado por el tamaño de los poros, siempre y cuando estén totalmente interconectados a través de aberturas mayores de 50  $\mu\text{m}$ ; ésta es la interconectividad entre los poros que promoverá la circulación del fluido corporal y la migración celular al núcleo del implante. Mastrogiacomo y col. (2006) consideran que la interconectividad de los poros de los andamios puede influir en la cantidad total de deposición de hueso, del patrón de invasión de los vasos sanguíneos y, finalmente, en la cinética del proceso de neoformación ósea.

La ingeniería de tejidos en el área de biomateriales ya ha desarrollado materiales que cumplen en mayor o menor grado estas propiedades; sin embargo, en la actualidad, sigue siendo un reto diseñar y encontrar el biomaterial idóneo que cumpla con todas las características antes mencionadas.

Los biomateriales clásicos que se han utilizado (metales, cerámicas y materiales compuestos de polímeros) para los dientes, las caderas, las rodillas, las válvulas cardíacas y los discos intervertebrales, proporcionan una capacidad limitada para reparar y regenerar el tejido. Como consecuencia, nuevos materiales con funcionalidad mejorada se han desarrollado mediante la modificación de los materiales existentes y la síntesis de nuevos. Compuestos nanoestructurados orgánico- inorgánicos que combinan la dureza de la fase de polímero y la fuerza de la fase inorgánica, parecen ser una solución muy prometedora para los materiales bioactivos con propiedades mecánicas y de biocompatibilidad mejoradas. Entre los polímeros más explotados en aplicaciones biomédicas, los más populares son los poliuretanos, debido a sus propiedades físicas y mecánicas en general favorables, junto con características de bastante buena biocompatibilidad y antitrombogenicidad. Además, recientemente los poliuretanos han recibido mucha atención para lograr polímeros degradables, debido a su gran potencial en la adaptación de su estructura polimérica para lograr las propiedades mecánicas y de biodegradabilidad adecuadas para aplicaciones de ingeniería de tejidos (Asefnejad *et al.*, 2011).

En los últimos años, entre los compuestos cerámicos, la hidroxiapatita (HAp) ha atraído mucho interés como material de implante para los dientes y los huesos debido a la similitud de su composición química y cristalografía a la de los tejidos duros humanos. En la mayoría de los casos, la solubilidad controlada de HAp es un factor importante, ya que induce bioactividad, osteoconductividad y efectos terapéuticos (Asefnejad *et al.*, 2011). Es así que, es uno de los

compuestos más estudiados en combinación con otros para la construcción de andamios para la regeneración ósea, valorada también por sus propiedades de biocompatibilidad. La presencia de partículas de HAp en un andamio imita la fase de apatita del hueso; además, la HAp exhibe excelentes propiedades reabsorbibles y osteoconductoras, y por lo tanto mejora la aposición ósea y facilita la unión del andamio con el tejido óseo circundante (Chuenjitkuntaworn *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de la HAp por sí sola es limitado debido a su fragilidad y la dificultad de transformarse en formas complejas (Liu *et al.*, 2009).

Los polímeros biodegradables se utilizan ampliamente como armazón poroso en ingeniería de tejido óseo. El poliuretano biodegradable es uno de los materiales más biocompatibles usados como matrices extracelulares temporales en los andamios de ingeniería de tejido óseo. Sin embargo, su principal desventaja es la falta de grupos bioactivos, lo que limita sus aplicaciones. Una solución es la mezcla de los poliuretanos con partículas cerámicas bioactivas tales como fosfato tricálcico o hidroxiapatita (HAp). La combinación de poliuretano y una cerámica podría mejorar la bioactividad y mejorar las propiedades mecánicas de los andamios porosos (Asefnejad *et al.*, 2011).

Es así que, en este proyecto se propone el uso de un biomaterial formado por ambos, el poliuretano y la hidroxiapatita, de cuya combinación se espera mejorar propiedades como la osteoinductividad, biodegradabilidad y bioactividad, así como mejorar las propiedades mecánicas como la resistencia y maleabilidad en la formación de estructuras tridimensionales, aprovechando sus propiedades intrínsecas como la osteoconductoras, reabsorbibilidad, biocompatibilidad y antitrombogenicidad.

## 2.7 Antecedentes

Respecto a la expresión de los marcadores osteogénicos de nuestro interés, a lo largo del proceso de osteogénesis, múltiples autores coinciden y aceptan teóricamente a la osteocalcina (considerada una proteína de unión al calcio comúnmente encontrada en la matriz orgánica de tejidos mineralizados como el hueso, dentina y el cemento) como el marcador tardío de la diferenciación osteoblástica que se expresa altamente en o cerca de la mineralización (Angwarawong *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Davies *et al.*, 2010; Kirkham y Cartmell, 2007; Tsai *et al.*, 2012). Otros coinciden de igual manera en considerar que el Colágeno tipo I se expresa altamente cerca del periodo proliferativo de los osteoblastos y durante el periodo de deposición y maduración de la matriz celular, ya que es la proteína más abundante en la matriz ósea que sirve como plantilla para la mineralización, pues su función es fundamental para el mantenimiento del fenotipo osteoblástico haciendo a la matriz competente para la mineralización y, es considerado un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica (Angwarawong *et al.*, 2011; Kirkham y Cartmell, 2007). Respecto a osterix, diversos autores consideran que es un factor de transcripción crítico en la diferenciación de los osteoblastos y que actúa en la regulación de la expresión de otros genes en los osteoblastos, como aquellos que codifican para la osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea y colágeno tipo I durante el proceso de osteogénesis (Kirkham y Cartmell, 2007; Nakashima *et al.*, 2002; Ohyama *et al.*, 2004), sin embargo no se detalla su perfil en una línea de tiempo durante el proceso de osteogénesis.

Sin embargo, experimentalmente, hasta el día de hoy, no existe un consenso entre los diversos estudios acerca del momento preciso y, por lo tanto, un perfil bien definido en una línea de tiempo de la expresión cada uno de estos genes, así por ejemplo:

De acuerdo a los resultados del estudio de Tsai y col. (2012), al evaluar la expresión del ARNm de los marcadores osteogénicos colágeno tipo I (CTI) y osteocalcina (OCN) en los días 3 y 28 de cultivos *in vitro* de osteoblastos de MC3T3-E1 se observó que CTI disminuye su expresión el día 28 comparado con el día 3 y que OCN aumenta su expresión en el día 28 comparada con el día 3.

En el estudio de Angwarawong y col. (2011), los resultados muestran que en cultivos celulares de MC3T3-E1 la expresión de ARNm de los marcadores sialoproteína ósea (BSP), OCN y CTI, medida el día 13, respecto a GAPDH, la BSP se encuentra más altamente expresada, seguida en orden de mayor a menor de la OCN, mientras que CTI se encuentra expresado en menor proporción a este tiempo.

En el trabajo de Hoemann y col. (2009), en cultivos celulares *in vitro* también, se observó que, una vez que los cultivos alcanzaron la confluencia, el CTI se expresó hasta la segunda y tercer semana.

En el estudio de Zhang y col. (2012), en la evaluación en cultivos *in vitro* de la expresión del colágeno tipo I, a los días 3, 6, 9 y 14, se observa que el CTI se encuentra ya expresado en el tercer día, incrementa su expresión a partir del día 6 (poco más de una vez la expresión observada en el día 3), posteriormente vuelve a disminuirla al día 9 a casi el mismo nivel que el día 3 y se mantiene así de manera casi constante hasta el día 14. En el mismo estudio, respecto a la evaluación de la expresión de OCN, ésta se mantiene sin grandes cambios a lo largo del tiempo, sólo ligeramente disminuida en el día 3 y ligeramente incrementada en el día 14.

A la fecha, se ha estudiado poco la expresión de osterix a lo largo del tiempo durante el proceso de osteogénesis y no existe un perfil claro de su expresión. Zhang y col. (2012) muestran en su estudio en cultivos *in vitro* evaluados los días 3, 6, 9 y 14, que la expresión de osterix aumentó en los días 6 y 9 aproximadamente una vez más a la expresión del día 3, y que en el día 14 ésta disminuyó poco menos de la mitad comparada con el día 9. Por otro lado, en el trabajo de Ohyama y col. (2004), se muestra cómo osterix aumenta su expresión en el transcurso de los días, evaluado en cultivos *in vitro* los días 0, 7 y 14.

Respecto a los biomateriales, se han diseñado múltiples compositos a base de hidroxiapatita combinada con otros materiales, principalmente polímeros, entre los que destacan el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, quitosana y colágeno; los respectivos estudios para su evaluación como sustitutos óseos, en la mayoría de los casos, aún se encuentran en la etapa de evaluación *in vitro* de la citotoxicidad, adhesión y proliferación celular, con excepción de algunos trabajos, en los que hay un mayor avance y se reporta la evaluación del proceso de diferenciación a través de marcadores osteogénicos (Chen *et al.*, 2012; Chuenjitkuntaworn *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009).

De importancia para nuestro proyecto referente a estos estudios, es la evidencia del efecto que tuvo en el biomaterial la incorporación de hidroxiapatita como componente estructural, mejorando las características de éstos y convirtiéndolos en materiales más idóneos como sustitutos óseos.

Un ejemplo de estos estudios es el realizado por Chen y col. (2012), donde se muestra que al agregar hidroxiapatita (HAp) a un andamio de quitosana (CS), la actividad de la fosfatasa alcalina aumentó significativamente en las células MC3T3-E1 cultivadas en andamios de CS/nHAp comparados con aquellos compuestos sólo por CS, también la expresión del ARNm de los genes osteocalcina, Runx-2 y

colágeno tipo I aumentó significativamente en aquellos cultivos con andamios CS/nHAp. Estos resultados indicaron que la adición de HAp a quitosana aumentó significativamente la diferenciación de los osteoblastos y estimuló en mayor grado la formación de la matriz. Los autores atribuyen este aumento en la producción de matriz mineralizada a que, cuando el fosfato de calcio que contienen los materiales (aportado por la HAp) se hidrata en el medio del cultivo celular, un proceso continuo de disolución y precipitación de iones de calcio y fosfato se produce. Esto crea una capa de apatita carbonatada densa en la superficie del andamio que es similar a la estructura del hueso nativo y por lo tanto puede inducir más rápidamente la diferenciación de osteoblastos y la mineralización. Tomados en conjunto estos datos de expresión de genes asociados con el fenotipo de los osteoblastos, proporcionan evidencia de que el andamio con HAp constituye un buen sustrato para la diferenciación de células MC3T3-E1, lo que conduce a la mineralización de la matriz extracelular.

Chuenjittkuntaworn y col. (2010) también fabricaron y evaluaron dos tipos de andamios fibrosos, uno conformado sólo por PLLA [Poli (ácido L-láctico)] y otro conformado por PLLA y partículas de HAp en cantidades de 0.25 y 0.50% (w/v), a los cuales se les evaluó su potencial como sustratos para el cultivo de células óseas. Se observó que la presencia de partículas de HAp en los andamios fibrosos de PLLA no sólo mejoró la adhesión y la proliferación de las células pre-osteoblásticas de ratón MC3T3-E1, sino que también aumentó la expresión de ARNm de osteocalcina, conexión-43 y colágeno tipo I; además, el grado de mineralización fue mayor en los andamios con HAp en ambas proporciones, principalmente en 0.50%, comparados con el andamio de PLLA (mejor resultado en 0.50% w/v, luego en 0.25% y después PLLA puro). En este estudio, los resultados obtenidos ofrecen evidencia del efecto de la hidroxiapatita en la proliferación y diferenciación celular. La presencia de HAp mejoró la osteoconductividad del material. Un dato interesante de este mismo estudio, donde también se

evaluó a un film de sólo PLLA en la expresión de los genes osteocalcina, colágeno tipo I y conexión-43, es que se observó que el film mostró menos expresión de todos los genes respecto a los andamios e incluso que el control positivo empleado, platos de cultivo de poliestireno (TCPS, por sus siglas en inglés, *tissue-culture polystyrene plate*).

Lui y col. (2009) evaluaron un andamio formado por gelatina/ apatita y reportan que la incorporación de ésta al compuesto, aumentó la diferenciación de las células osteoblásticas, demostrada por el aumento de la expresión de la sialoproteína ósea y la osteocalcina de osteoblastos: cinco y dos veces más, respectivamente, en el compuesto con hidroxiapatita comparado con el compuesto que no la contenía.

En el caso de biomateriales compuestos específicamente por poliuretano e hidroxiapatita juntos, existen contados estudios con estos materiales, en distintas proporciones y diferentes métodos de síntesis; todos son estudios cuya evaluación se encuentra apenas en etapas de síntesis y caracterización del material, o en su defecto, en la etapa inicial de la evaluación de citotoxicidad y proliferación celular al contacto con los biomateriales, sin embargo, ninguno evalúa la expresión de marcadores en el proceso osteogénico (Boissard *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2009; Laschke *et al.*, 2010).

En el estudio más reciente, Popescu, Piticescu y col. (2013) reportaron la síntesis y caracterización de un biomaterial compuesto por hidroxiapatita y poliuretano funcionalizado con grupos carboxilo y tiol, en proporciones 4:1 y 1:4. La síntesis la realizaron por medio de un proceso hidrotermal bajo condiciones de alta presión; llevaron a cabo también una evaluación *in vitro* de la viabilidad, adhesión y proliferación celular, sin embargo, no se llevó a cabo la evaluación de ningún marcador

osteogénico. Este estudio se encuentra apenas en las primeras etapas de la evaluación biológica del compuesto, y tiene como característica particular ser una película para revestimiento de implantes.

En el trabajo de Martínez y col. (2011), se preparó y caracterizó microestructuralmente el biomaterial híbrido poliuretano/nano-hidroxiapatita por un proceso de síntesis por precipitación asistida de ultrasonido. Los resultados de este estudio sugieren que el nanohíbrido podría ser adecuado para aplicaciones en el cuerpo humano, por lo que se sugiere continuar con el análisis biológico del material en cultivos celulares. De este trabajo surge un grupo de colaboración interdisciplinario, por el cual se planteó el presente proyecto.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La necesidad de ofrecer una mejor calidad de vida a personas que sufren padecimientos crónicos por pérdida de masa ósea, ha conducido a la búsqueda e investigación de materiales para implantes o sustitutos óseos que, además de su función como soporte mecánico, permitan la regeneración ósea.

Se argumenta que los materiales compuestos de un cerámico y un polímero mejoran sus propiedades al combinar las características intrínsecas de cada uno, y que la composición óptima de PU y HAp posibilitará el guiar el proceso de regeneración ósea al fungir como una matriz en la que las células encuentren un lugar adecuado para adherirse, proliferar y especializarse hasta formar nuevo tejido óseo, mismo que irá sustituyendo poco a poco al biomaterial mientras éste se degrada o reabsorbe.

### **4. HIPÓTESIS**

Los biomateriales compuestos de poliuretano y nano-hidroxiapatita, con composiciones al 20% en peso de hidroxiapatita y menores, estimulan la diferenciación celular y la mineralización de tejido óseo neoformado.

## 5. OBJETIVOS

**5.1 Objetivo general.** Determinar *in vitro* la composición óptima del híbrido poliuretano/hidroxiapatita que presente el mejor estímulo de diferenciación celular y mineralización ósea.

### 5.1.1 Objetivos específicos

- Evaluar si los compositos de PU/nHAp presentan efectos inhibitorios sobre la proliferación de células MC3T3-E1.
- Evaluar la adhesión, proliferación y diferenciación celular sobre cada composición del biomaterial.
- Evaluar el grado de mineralización ósea del tejido formado sobre cada composito.
- Evaluar el fenotipo osteoblástico a través de marcadores osteogénicos (Osterix, Colágeno tipo I, Osteocalcina).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material a evaluar

Biomaterial híbrido de poliuretano/nano-hidroxiapatita (PU/nHAp) con composiciones en peso de hidroxiapatita del 5, 10 y 20%. Biomaterial de forma esférica, con un diámetro promedio de 4 mm y tamaño del diámetro del poro de 5  $\mu\text{m}$ , preparado, caracterizado y proporcionado por Martínez-Valencia y Carbajal-De la Torre de la Facultad de Ingeniería Mecánica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo UMSNH.

### 6.2 Modelo celular

Como modelo se utilizó la línea celular MC3T3-E1 subclona 4 (ATCC CRL-2593) bajo condiciones de proliferación y diferenciación. Esta línea celular de preosteoblastos de ratón (*Mus musculus*) presenta características de crecimiento adherente con morfología fibroblástica y ha sido ampliamente utilizada para estudios de diferenciación y regeneración ósea. La línea celular MC3T3-E1 subclona 4 exhibe altos niveles de diferenciación a osteoblastos después del crecimiento en medios de cultivo que contienen ácido ascórbico y fosfato inorgánico, formando una matriz extracelular bien mineralizada después de 20 días. También, la subclona 4 expresa selectivamente ARNm para marcadores de osteoblastos, como la sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN), la hormona paratiroidea (PTH) y la proteína relacionada con el receptor de la hormona paratiroidea (PTHrP). Esta línea celular es un buen modelo para el estudio de la diferenciación de osteoblastos in vitro, particularmente en la señalización de la matriz extracelular (Wang *et al.*, 1999).

## **6.3 Análisis biológicos**

### **6.3.1 Preparación del biomaterial**

Para esterilizar el biomaterial previo a su uso, se llevó a cabo el siguiente protocolo: en tubos cónicos de 14 mL se colocaron esferas de cada muestra de biomaterial a evaluar por separado (biomaterial de poliuretano con nHAp al 5, 10 y 20% en peso), se agregaron 6 mL de etanol al 70% y se dejaron en un agitador por 6 h. Transcurrido ese tiempo y bajo condiciones de esterilidad se retiró el etanol, se lavó el biomaterial 2 veces con agua tridestilada y una vez con PBS (buffer fosfato salino, conocido por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) estériles. Se colocaron en cajas de petri destapadas, donde se dejaron secando dentro de la campana de flujo laminar por más de 8 horas y con exposición a luz UV. Se almacenaron en condiciones estériles hasta su uso.

### **6.3.2 Cultivos celulares**

La siembra para ensayos de proliferación se llevó a cabo en Medio Mínimo Esencial  $\alpha$  (MEM- $\alpha$ , INVITROGEN), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (INVITROGEN) y antibiótico (amikacina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se trabajó con cinco grupos de cultivo, correspondiendo cuatro de ellos a cada una de las distintas composiciones del biomaterial a evaluar y un cuarto correspondiente al grupo control (sin biomaterial). Los cultivos se incubaron a 37 °C y una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Los ensayos de diferenciación celular se realizaron en medio MEM- $\alpha$  sin y con 50 mg/L de ácido ascórbico (SIGMA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (INVITROGEN) y antibiótico (amikacina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se trabajó con el grupo control y los cuatro grupos de cultivo que contenían a

cada composición de biomaterial (PU/ 0, 5, 10 y 20 % de nHAp en peso). Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C y una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para evaluar viabilidad, proliferación y citotoxicidad, el biomaterial estéril se colocó sobre placas de cultivo de 1.9 cm<sup>2</sup> y 45 mil células/cm<sup>2</sup> en 0.5 mL de medio MEM- $\alpha$  sin ácido ascórbico y se incubó por 4 días. Se agregó un 10% en volumen de azul de alamar, se incubó durante 2 h para posteriormente retirar el sobrenadante y realizar las lecturas espectrofotométricas, como se describe más adelante. Se volvió a agregar medio fresco para continuar con la incubación de los 4 días. El procedimiento se realizó a las 24, 48 y 96 horas.

Para evaluar el estímulo de la presencia del biomaterial sobre el proceso de diferenciación ósea, el biomaterial estéril se colocó sobre placas de cultivo de 10 cm<sup>2</sup>. Sobre cada biomaterial se colocaron alrededor de 200 mil células suspendidas en 2 mL de medio MEM- $\alpha$  sin ácido ascórbico y se incubaron el tiempo necesario hasta alcanzar una confluencia celular de alrededor del 90% en los platos, es decir cuando la superficie de la placa se encontraba cubierta por alrededor de un 90% de células. En ese momento se indujo la diferenciación celular a la mitad de los cultivos, tal que para cada composición del biomaterial hubo un cultivo con medio MEM- $\alpha$  sin ácido ascórbico y otro al cual se le cambió el medio de cultivo por medio MEM- $\alpha$  con ácido ascórbico (50 mg/L), además de los respectivos cultivos control que no contenían biomaterial. Se mantuvieron en la incubadora a 37° C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó cambio de medio cada tercer día para renovar nutrientes. Se montaron tantos cultivos como fueron necesarios para sacrificar una muestra de cada condición a distintos tiempos posteriores a la inducción de la diferenciación hasta los 28 días. En cada toma de muestra, una vez retirado el medio de cultivo y el biomaterial correspondiente, se lavó la superficie

dos veces con PBS, luego se agregó directamente Trizol, de 200 a 350  $\mu$ L de acuerdo al transcurso de los días del cultivo, y con ayuda de un “policía” se retiró la capa celular o tejido celular formado y adherido a la superficie del plato, se pasó todo el contenido a un tubo eppendorf y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Por otro lado, cada biomaterial fue lavado 2 veces con PBS, fijado, deshidratado y almacenado para los análisis microscópicos que se describen más adelante.

### **6.3.3 Ensayos de proliferación, viabilidad y citotoxicidad**

#### **6.3.3.1 Azul de tripano para medir la concentración y viabilidad celular**

La prueba de exclusión del azul tripano es un método ampliamente empleado para discernir entre una célula viva y una muerta. El azul tripano es un colorante supravital que se incorpora a las células muertas. Este método se utilizó para determinar la concentración y viabilidad celular en cultivos en estado proliferativo (MEM- $\alpha$  sin ácido ascórbico) durante la resiembra de la línea celular y durante el montaje de los distintos experimentos.

Al cultivo a muestrear se le retiró el biomaterial y el medio de cultivo; el cultivo se lavó dos veces con PBS y el biomaterial se pasó a un nuevo plato para llevar a cabo la fijación del mismo, de acuerdo al protocolo que más adelante se describe. A los cultivos previamente lavados, se les agregó 300  $\mu$ L de tripsina (0.25% tripsina/EDTA- SIGMA) a cada uno. Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta el desprendimiento de las células y por no más de 10 minutos. Una vez desprendidas las células, se inhibió la tripsina agregando 500  $\mu$ L de medio de cultivo. El contenido se pasó a tubos eppendorf de 1.5 mL, cada uno a su correspondiente tubo etiquetado. En un nuevo tubo de ensayo para cada muestra, se colocaron 100  $\mu$ L de cada una de las suspensiones anteriores y azul de tripano al 0.08% (SIGMA) para llevar a cabo el conteo celular en una cámara de Neubauer.

Las proporciones entre la muestra y el colorante variaron de acuerdo al factor de dilución requerido, según la cantidad de células aproximadas esperadas en cada cultivo, considerando que para un conteo confiable debería diluirse a un factor tal que hubiera entre 200 y 400 células en los 10 cuadros a contar. Las suspensiones celulares se contaron en un microscopio de luz invertido (LEICA) a un aumento de 100x. Se contabilizaron las células usando un contador manual y contando, de cada una de las dos retículas cuadrangulares, los cuadros de cada una de las cuatro esquinas y el cuadro central de cada cámara, es decir, en total se cuenta en 10 cuadros del hematocitómetro.

Concentración (millones de células/mL) = Conteo en 10 cuadros x factor de dilución x 0.001

Donde:

Factor de dilución= (vol. Muestra + vol. Colorante)/ vol. Muestra

0.001 es el factor de conversión del volumen para el hematocitómetro de Neubauer cuando se cuentan 10 cuadros.

Total de células = Células/mL x volumen total original de la suspensión celular

La concentración será para células viables, muertas o totales dependiendo de si en la fórmula se utiliza el número de células no teñidas (viables), el de células teñidas de azul (muertas), o el total de las células (viables más muertas). La viabilidad se expresa como el porcentaje de células viables en la población total.

% Viabilidad= (No. células viables/ No. células totales) x 100.

El resto del contenido celular de los tubos eppendorf se centrifugó a 200 rcf por 6 min. Se retiró el sobrenadante, se agregó PBS y se volvió a centrifugar a 200 rcf por 5 min. Se retiró el sobrenadante, dejando sólo el pellet y se agregaron de 50 a 100 µL de TRIZOL LS Reagent (INVITROGEN) a cada uno. Finalmente se guardaron a -70°C hasta su uso.

### **6.3.3.2 Ensayo Azul de Alamar para medir la viabilidad/citotoxicidad y proliferación celular**

El Ensayo de AlamarBlue® está diseñado para medir cuantitativamente la proliferación de diversas líneas celulares humanas y animales, bacterias y hongos. El bioensayo también puede ser usado para establecer la citotoxicidad relativa de diversos agentes químicos.

El ensayo Azul de Alamar mide la actividad metabólica celular a través de la conversión de la resazurina. La resazurina (tinte azul no fluorescente) es reducida por las enzimas mitocondriales y otras enzimas a resorufina (rosa fluorescente). La resorufina puede ser detectada por espectrofotometría o fluorometría. Dado que ambos, la resazurina sustrato oxidado y la resorufina producto reducido, son solubles en agua y no muestran efectos citotóxicos, es posible realizar varios ensayos o mediciones cinéticas en el mismo conjunto de células. La cantidad de resorufina es directamente proporcional al número de células viables. Esta determinación se realizó en cultivos de 24, 48 y 96 horas como se mencionó con anterioridad.

Se siguió el protocolo sugerido por el proveedor donde primeramente se descongela y atempera el Azul de Alamar (INVITROGEN). En condiciones de esterilidad, se adiciona a los cultivos de interés en una proporción equivalente al 10 % del volumen del cultivo y se incluyen controles negativos que consisten de medio sin células, con y sin azul de Alamar. Los cultivos se regresaron a la incubadora (37 °C y 5% CO<sub>2</sub>). Una vez transcurridas 2 horas posteriores a la adición del azul de Alamar, en

condiciones de esterilidad, se colectó 0.5 mL del sobrenadante de cada cultivo y de los controles negativos; a estos cultivos se les añadió 0.5 mL de medio de cultivo para realizar el mismo procedimiento 24, 48 y 96 horas después. Entonces a las muestras de sobrenadante colectado se les midió la absorbancia en un espectrofotómetro visible (GENESYS 20, Spectronics Instruments) a 570 y 600 nm. La absorbancia a 600 nm mide la mayor cantidad de la forma oxidada (resazurina) y la absorbancia a 570 nm mide la mayor cantidad de la forma reducida (resorufina).

La concentración celular viable es proporcional al porcentaje de la forma reducida del Azul de Alamar, que se determina con la siguiente ecuación:

$$AR_{LW} = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$$

Donde:

$$R_0 = \text{factor de corrección. } R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$$

$$AO_{LW} = AO_{570} = \text{Abs a 570 nm del medio con azul de alamar} - \text{Abs a 600 nm del medio solo.}$$

$$AO_{HW} = AO_{600} = \text{Abs a 600 nm del medio con azul de alamar} - \text{Abs a 600 nm del medio solo.}$$

$$A_{LW} = A_{570} = \text{Abs a 570 nm de la muestra} - \text{Abs a 570 nm del medio solo.}$$

$$A_{HW} = A_{600} = \text{Abs a 600 nm de la muestra} - \text{Abs a 600 nm del medio solo.}$$

La citotoxicidad se expresa generalmente como el nivel LD50, y es la dosificación de un material que es mortal a 50 por ciento de una población probada. Para los cálculos de citotoxicidad se utiliza la siguiente ecuación que representa el porcentaje de diferencia entre el cultivo tratado y el cultivo control, es decir, la viabilidad relativa:

Viabilidad relativa = [% Reducción del cultivo tratado / % Reducción del cultivo control] X 100

$$= \frac{A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \text{ de la muestra}}{A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \text{ control positivo de crecimiento}} \times 100$$

Así, cuando los valores de “viabilidad relativa” sean menores al 50%, se puede afirmar que la composición del biomaterial es citotóxico.

### 6.3.4 Grado de mineralización ósea

#### 6.3.4.1 Tinción histoquímica con rojo de alizarina S

Se dio seguimiento a los cultivos haciendo cambio de medio cada tercer día y hasta los 22 días de cultivo. Después de inducida la diferenciación celular por la adición de ácido ascórbico en cultivos *in vitro*, se evaluó el grado de mineralización ósea por tinción histoquímica con rojo de alizarina S (SIGMA), cuantificando los depósitos de calcio a los 11 y 22 días de cultivo. A las placas de cultivo se les retiró el medio, se lavaron dos veces con solución PBS, se fijaron con 500 µL de solución fijadora (2% v/v paraformaldehído y 0.2% v/v glutaraldehído en PBS 1x; SIGMA) durante 5 min y se enjuagaron dos veces con PBS. Para revelar minerales, se tiñeron durante 20 min en oscuridad con 1 mL de una solución al 1.37% w/v de rojo de alizarina S disuelta en agua tridestilada. Se retiró la solución de rojo de alizarina y se lavaron los cultivos con agua tridestilada, tantas veces fue necesario hasta la eliminación del exceso de rojo de alizarina S (hasta que el agua salió clara). Se observaron los nódulos teñidos al microscopio. Para una cuantificación más precisa, se adicionaron 2 mL de una solución detergente de SDS (dodecilsulfato sódico) al 5 % en HCl 0.5 N y se mantuvo en oscuridad durante 20 min para solubilizar el rojo de alizarina S fijado en los nódulos de calcio de la matriz extracelular. Se colectó el contenido de cada muestra en una celdilla para espectrofotómetro y se

medió la absorbancia a 415 nm. Como blanco se utilizó la solución SDS-HCl. La absorbancia es proporcional al número de nódulos teñidos, permitiéndonos determinar el grado de mineralización con respecto a un cultivo control (cultivo sin biomaterial).

### **6.3.5 Evaluación de marcadores de osteogénesis por RT-PCR**

#### **6.3.5.1 Extracción de ARN**

Se empleó para este fin el Trizol, el cual es un reactivo listo para utilizarse en el aislamiento de ARN de células y tejidos, es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que, durante la homogenización o lisis de la muestra, mantiene la integridad del ARN al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo seguida de una centrifugación separa la muestra en una fase clara superior acuosa (fase acuosa que contiene el ARN), una fase intermedia y una fase inferior orgánica rojiza (que contiene ADN y proteínas). El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa y puede ser recuperado por precipitación con alcohol isopropílico; una vez removida la fase acuosa, el ADN y las proteínas en la muestra se pueden ser recuperar por precipitaciones secuenciales de la misma. El ARN aislado puede ser empleado para RT-PCR.

Para la obtención de ARN de las células se empleó el reactivo TRIZOL LS Reagent (INVITROGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células de cada cultivo se recuperan removiendo primero el medio de cultivo, lavándolas con PBS dos veces y desprendiéndolas con tripsina, misma que es neutralizada con medio de cultivo. Como se mencionó con anterioridad, con una pequeña porción de la suspensión celular se determina la concentración y viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano. El resto de la suspensión se centrifugó a 200 rcf por 6 minutos, se lavó la pastilla celular con PBS, se volvió a centrifugar y la

pastilla celular limpia se resuspendió con 1 mL de Trizol por cada 5-10 millones de células. Este procedimiento se llevó a cabo para los cultivos en condiciones de proliferación celular (medios de cultivo sin ácido ascórbico). Para los cultivos inducidos a la diferenciación celular, en los cuales las células se encuentran adheridas a la pared con más fuerza, se retiró el medio de cultivo, se lavó dos veces con PBS, se agregó directamente el Trizol y con ayuda de un policía se desprendió la capa celular. En ambos casos, posterior a la adición de trizol, las muestras se homogenizan por pipeteo y pueden ser almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  o procesarse como se describe a continuación. A la muestra atemperada a temperatura ambiente (TA) se le da vortex por 15-30 s y se deja reposando a TA durante 5 minutos. Se añaden 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol, se agita vigorosamente durante 15 segundos, se reposa a TA durante 3 minutos y se centrifuga a 16,000 rcf y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos para recuperar la fase acuosa (fase superior) que es la que contiene al ARN. El ARN se precipita con la adición de isopropanol (0.5mL/mL Trizol) y manteniendo a  $-20^{\circ}\text{C}$  mínimo 8 horas; el ARN precipitado se recupera por centrifugación a 16,000 rcf y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, se lava con etanol al 75% (1 mL/mL Trizol), se centrifuga a 16,000 rcf y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, se remueve el etanol y se aérea la pastilla en la campana de flujo laminar durante 10 minutos. Finalmente, se suspende en 22  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas, mezclando por vortex. Se toman 2  $\mu\text{L}$  para determinar la concentración de ARN obtenido. Una vez determinada la concentración de ARN se agrega agua libre de ARNasas, la necesaria para que la concentración final del volumen total del tubo quede a 1  $\mu\text{g}$  de ARN/ $\mu\text{L}$  y se agregan 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ARNasas RNAsin (RNasin recombinante, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , PROMEGA). Finalmente se almacenará a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La pureza y concentración del ARN se determinó por el método de espectrofotometría UV. Para esto, la absorbancia de una muestra de ARN diluido (2  $\mu\text{L}$  de muestra en 1 mL de agua destilada) se mide a 260 y 280 nm. La concentración de ARN total se determina por medio de la ley de Beer-Lambert la cual nos dice que: una  $A_{260}$  de 1.0 es equivalente a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN. El grado de pureza del ARN total

se determina por la relación  $A_{260}/A_{280}$ ; valores entre 1.8 y 2.1 son indicativo de ARN altamente puro.

Una muestra contaminada con proteínas o fenol, dará una proporción menor o no se podrá realizar la cuantificación adecuada.

### 6.3.5.2 Síntesis de ADNc

Se tomaron muestras de ARN total para cada condición de estudio y se sometieron a una transcripción reversa para obtener el ADN complementario (ADNc), utilizando el Kit SuperScript® First Strand – Synthesis System (INVITROGEN). El ADNc sintetizado en la transcripción reversa se utilizó para cuantificar la expresión de los genes que codifican para osteocalcina, osterix, colágeno I y GAPDH (control interno, por ser un gen de expresión constitutiva o gen “housekeeping”). Esta técnica se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante que brevemente se describen a continuación para una reacción de 20  $\mu$ L. En un tubo de microcentrífuga se agregan 2 pmoles del cebador reverso específico del gen, 1  $\mu$ g de ARN total, 10 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), y suficiente agua tridestilada estéril para llevar el volumen a 12.7  $\mu$ L. La mezcla se calienta a 65 °C durante 5 minutos, seguido de un enfriamiento rápido en hielo y una centrifugación breve de 5 segundos a 1,000 rcf para bajar el contenido del tubo. El tubo se mantiene en hielo y se le agrega 4  $\mu$ L del amortiguador de la reacción (5X First Strand Buffer) y 2  $\mu$ L de DTT 0.1 M; se mezcla suavemente el contenido del tubo y se incuba a 42 °C durante 2 minutos. Finalmente, se añaden 160 unidades (0.8  $\mu$ L) de la enzima reverso transcriptasa (SuperScript II RT), se mezcla suavemente por pipeteo y se centrifuga brevemente por 5 segundos a 1,000 rcf para bajar el contenido del tubo. La reacción se deja a 42 °C durante 50 minutos y se inactiva por calentamiento a 70 °C durante 15 minutos. Como paso opcional, se recomienda remover ARN complementario al ADNc, para esto, se añade 0.0024 unidades de ARNasa A (0.5  $\mu$ L a concentración de 40 ng/ $\mu$ L) (SIGMA, 120 U/mg) y se

incuba a 37 °C durante 20 minutos. Este procedimiento se repite con el cebador reverso correspondiente a cada gen cuya expresión se desea determinar, incluyendo el gen de la GAPDH que nos permitirá normalizar los ensayos para expresar los resultados en términos de expresión relativa. Con esta técnica se obtiene el ADNc para cada gen de estudio. El ADNc se almacena a -20 °C hasta su uso.

Inicialmente la síntesis de ADNc se hizo de manera independiente para cada gen. En ensayos posteriores, el protocolo se modificó para generar una mezcla única con todos los genes a evaluar (GAPDH, OCN, OTX y CTI), es decir, en una misma reacción y tubo. Para esto, se colocó 1 µL de cada suspensión stock de cada oligo 3' (a concentración de 100 pmol/µL ó 100 mM) en un volumen final de agua tridestilada estéril de 50 µL, obteniendo una mezcla final a una concentración de 2pmol/µL de cada oligo. Esta mezcla de cebadores sustituyó al cebador reverso específico de un gen en el protocolo antes descrito.

### **6.3.5.3 Amplificación de genes por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)**

Se empleó la técnica de PCR (Herráez y Luque, 2002) para la amplificación de los siguientes marcadores osteogénicos: colágeno tipo I, osteocalcina y osterix, y para el gen constitutivo (control: GAPDH). El ADNc obtenido previamente se amplificó mediante PCR utilizando los primers específicos para cada gen y una ADN polimerasa de alta fidelidad (Platinum® Pfx DNA Polymerase, INVITROGEN). Se siguió el siguiente protocolo para un volumen de reacción de 50 µL: en un tubo se agregan 5 µL del buffer de amplificación 10X (final 1X), 1.5 µL de una mezcla de dNTP 10 mM (final 0.3 mM de cada uno), 1 µL de MgSO<sub>4</sub> 50 mM (final 1 mM), 5 µL de cada cebador (final 0.2 µM de cada uno), 2 µL de la reacción donde se obtuvo el ADNc, 0.25 µL de la ADN polimerasa (0.625 unidades), y suficiente agua tridestilada estéril para llevar la reacción a un volumen final de 50 µL. Se mezcla el contenido del tubo

y se centrifuga brevemente para bajar la mezcla. Se coloca en un termociclador (Eppendorf) con un programa que consiste en 3 pasos:

- a) Para PCR de punto final: 1) desnaturalización del templado a 94 °C durante 2 minutos; 2) 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 68 °C por 22 segundos (60 segundos por fragmento de 1000 pb a extender); y 3) 7 minutos de elongación adicionales a 68°C.
- b) Para PCR semi-cuantitativa: 1) desnaturalización del templado a 94 °C durante 2 minutos; 2) 25 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 68 °C por 22 segundos (60 segundos por fragmento de 1000 pb a extender); y 3) 7 minutos de elongación adicionales a 68°C.

Inicialmente, se hicieron pruebas de PCR de punto final, a 35 ciclos, con cada uno de los genes y de las muestras tomadas inicialmente cada dos días, de cultivos con y sin inducción de la diferenciación con ácido ascórbico. Los productos PCR de cada prueba fueron medidos por electroforesis en gel de agarosa al 1% y en base a los resultados obtenidos de las intensidades de las bandas de las distintas muestras, se decidió utilizar aquellas muestras con mayor producto PCR en las pruebas de estandarización para encontrar las condiciones más apropiadas para una PCR semi-cuantitativa para cada marcador a evaluar, a partir de esas pruebas la PCR semi-cuantitativa quedó a 25 ciclos para GAPDH y 35 ciclos para el resto de genes.

### **6.3.5.3.1 Análisis de productos de PCR por electroforesis**

Las distintas muestras de ADN amplificado se analizaron por electroforesis, en geles del agarosa al 1% en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 6.8) con 2  $\mu$ L de bromuro de etidio (5 mg/mL). Antes de cargar el marcador de peso molecular y las muestras de ADN, a éstas últimas se les agrega un colorante de carga 10X (1 $\mu$ L/9 $\mu$ L de muestra), el cual contiene 50% de sacarosa, 0.05 g de azul de bromofenol y 0.05 g de xilencianol en 10 mL de agua desionizada estéril. Una vez colocadas las muestras con colorante y el marcador de peso molecular (Marcador de PM 1Kb Plus Ladder-Invitrogen) en los pozos del gel preformados por el peine, se realiza el corrimiento a 80 voltios. Finalmente, se examina el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Hoefer Macro Vue UV-20) y se adquiere una imagen del gel con un fotodocumentador (KODAK). El programa Kodak Digital Science 1D del ordenador permite determinar el peso molecular, medir la densidad óptica y, por lo tanto, la concentración (intensidad) de cada banda. La expresión relativa de cada gen se determina como la relación de intensidades de la banda del gen de interés entre la intensidad de la banda del gen GAPDH.

### **6.3.5.3.2 Análisis de productos de PCR por espectrofotometría y tinción con Azul de Toluidina.**

Los productos de PCR también se analizaron por medio de la técnica de espectrofotometría con tinción con azul de toluidina (TBO), propuesta por Killen (1995) para medir pequeñas cantidades de ADN (submicrogramos) sintetizados por amplificación por PCR. Esta técnica se sustenta en el hecho de que, los colorantes catiónicos de tiazina, tales como el azul de toluidina, son una clase de compuestos que muestran un cambio de color al unirse a polianiones, como los ácidos nucleicos, a bajas concentraciones. En este cambio de color inusual los colorantes muestran una disminución en la absorción a la longitud de onda máxima en la unión a un polianión, impartiendo así un color diferente

del colorante en sí mismo sobre la sustancia teñida; efecto conocido en histología como tinción metacromática. Es así que el azul de toluidina, a partir de su longitud de onda de máxima absorción, 628 nm, mostrará una disminución en la absorción al unirse a ADN a bajas concentraciones. Al usar azul de toluidina a una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M habrá una respuesta lineal al aumentar la concentración de ADN hasta 2,000 ng en un ensayo de 500  $\mu$ L. El límite inferior de detección es de 24 ng de ADN. Por lo que el ensayo de azul de toluidina es suficientemente sensible para la detección y medición de cantidades en el rango de submicrogramos de ADN producido en una PCR típica. El cambio de color a la unión al ADN es inmediato y a temperatura ambiente, lo que permite hacer mediciones rápidas al momento. Comparado con otros ensayos colorimétricos el ensayo con azul de toluidina es 10 a 100 veces más sensible (Killen, 1995).

Primeramente, se llevó a cabo una simulación de PCR utilizando todos los reactivos involucrados en una reacción típica de PCR y, utilizando para la medición de ADN un plásmido de concentración inicial conocida (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) en mezclas con TBO 1X a distintas concentraciones. La absorbancia de cada mezcla, es decir, del complejo ADN-colorante, se mide a 628 nm (correspondiente al pico de absorción del colorante en solución acuosa) en el espectrofotómetro visible GENESYS 20 y a partir de estos datos se obtiene un gráfico, que posteriormente será de utilidad para determinar la concentración de ADN de las distintas muestras a evaluar.

Para obtener la curva de referencia Abs vs ADN, se preparó ADN en agua a 0, 50, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 ng/ 20  $\mu$ L. Se utilizó un plásmido comercial de concentración conocida, el pGL3 (1  $\mu$ g/ $\mu$ L, PROMEGA). Se preparó TBO 1X ( $2 \times 10^{-5}$  M) y para cada muestra se colocaron 1980  $\mu$ L de TBO 1X en una celda y se le agregaron 20  $\mu$ L de muestra de ADN. Se mezcló y se tomó lectura en un espectrofotómetro a 628 nm, usando agua destilada como blanco. La figura 1 muestra la curva de referencia. El protocolo que se siguió con las distintas muestras a evaluar consistió en preparar una

solución stock de azul de toluidina 100X (diluyendo en 50 mL de agua tridestilada 30.5 mg de azul de toluidina en polvo, SIGMA). Posteriormente, a partir de esta solución, se prepara una solución de trabajo 1X, mezclando 1 parte de TBO 100X con 99 partes de agua destilada, se prepara tanto volumen como es necesario para todas las muestras a evaluar cada vez.

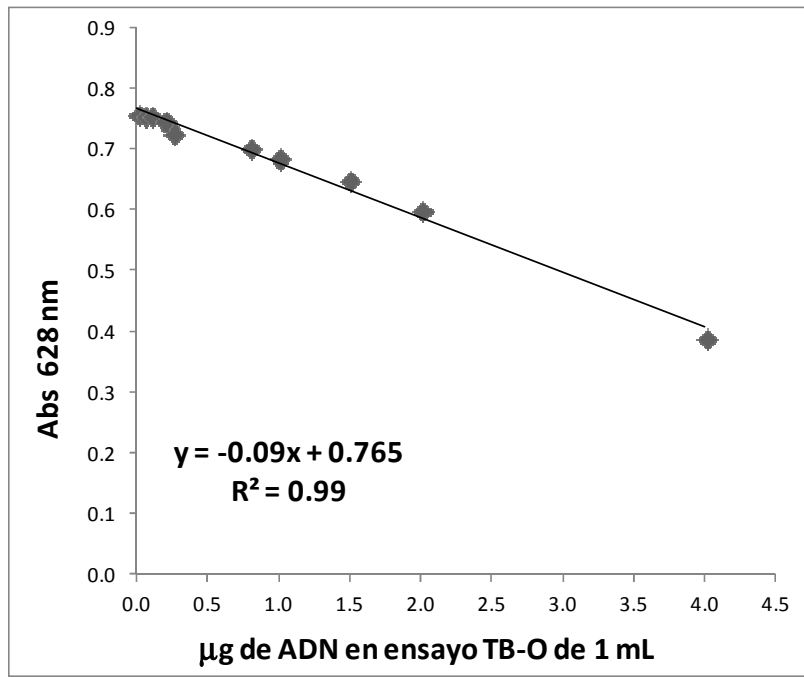


Figura 1. Curva de referencia para cuantificar la concentración de ADN por el ensayo TBO. Se utilizó el plásmido pGL3 de concentración conocida (1 µg/µL) a diferentes diluciones con azul de toluidina.

La curva de referencia se validó para la cuantificación de ADN en muestras de PCR. Se determinó el cambio en la magnitud de la absorbancia por efecto de cada uno de los componentes de la reacción de PCR (buffer de amplificación, mezcla de dNTPs, MgSO<sub>4</sub>, cebadores, ADNc, ADN polimerasa) con respecto al valor máximo de absorbancia obtenida con TBO 1X. Se encontró que sólo el ADNc tiene un efecto importante en el cambio de la magnitud de absorbancia (valor de  $0.02 \pm 0.01$  al utilizar 10

$\mu\text{L}$  de muestra en 2 mL de volumen final con TBO), por lo que sólo se tomaron como válidas aquellas reacciones de PCR cuya diferencia fuese mayor a 0.1 de absorbancia con respecto a la absorbancia del TBO. Se valida que a partir del gráfico mostrado en la figura 1 es posible hacer determinaciones de la concentración de ADN de las distintas muestras de PCR.

Las muestras de PCR a evaluar se dejaron en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron por 20 s a 2550 rfc, se les dio vortex por 20 s y se centrifugaron nuevamente por 20 s a 2550 rfc. Se tomó un volumen determinado de cada muestra (4, 5 o 10  $\mu\text{L}$ ) y se llevó a un volumen final de 2 mL con TBO 1X. Se utilizó como blanco 2 mL de agua tridestilada y como valor máximo de absorbancia la lectura obtenida con 2 mL de TBO 1X.

### **6.3.6 Análisis de la superficie del biomaterial por microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS)**

#### **6.3.6.1 Preparación del biomaterial para el microscopio electrónico de barrido**

Después de coleccionar la muestra biológica de los cultivos, el biomaterial recuperado se lavó 2 veces con PBS, y se fijaron las células adheridas al mismo con 200  $\mu\text{L}$  de solución fijadora (2 % v/v paraformaldehído y 0.2 % v/v glutaraldehído en PBS) durante 30 min, posteriormente se lavó 2 veces con PBS. Finalmente, para poder realizar el análisis en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F FEG-SEM del IIM-UMSNH, los biomateriales deberían estar libres de agua. Esto se consiguió colocando el biomaterial en soluciones crecientes de etanol al 25, 50, 75 y 98% durante 10 minutos cada una, repitiendo el procedimiento con el etanol al 98%. Finalmente se retiró el etanol y se secaron dentro de una campana de flujo laminar por más de 8 horas. Las muestras de biomaterial se guardaron a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Las muestras destinadas al microscopio electrónico de barrido (MEB) deberían ser conductoras, por ello, previo al análisis, cada muestra es recubierta por una fina capa de oro. Este procedimiento se hace al vacío con el apoyo del personal técnico adscrito al MEB del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la U.M.S.N.H.

### **6.3.6.2 Análisis por EDS**

El microscopio electrónico de barrido acoplado a un espectroscopio de rayos X, permite hacer un análisis químico de la superficie de los biomateriales por medio de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS). El análisis EDS es un procedimiento para identificar y semicuantificar la composición elemental de áreas de muestra hasta con tamaño tan pequeño como de algunos micrómetros cúbicos. El material de muestra es bombardeado con un haz de electrones de un MEB y los rayos X emitidos por el material son medidos y analizados con un espectroscopio de rayos X. Cada elemento tiene una longitud de onda característica y puede ser identificado por ésta.

De este modo, muestras de las distintas composiciones del biomaterial bajo distintas condiciones de cultivo, fueron analizadas por medio de EDS y comparadas con muestras en ausencia de células, de lo cual se obtuvieron datos de la deposición de calcio (Ca), contenido de carbono (C), y la relación calcio/fósforo (Ca/P) de cada muestra. Datos que se relacionan con el nivel de mineralización sobre cada material, la adherencia y proliferación celular, y la inducción de la diferenciación celular, respectivamente.

Los estudios de EDS con el MEB se llevaron a cabo en el IIM-UMSNH con el apoyo de los responsables del MEB.

### **6.3.7 Análisis estadístico**

En cada experimento descrito con anterioridad, cada condición particular se comparó con su respectivo control.

Se utiliza estadística descriptiva para presentación de resultados. Se lleva a cabo un análisis de correlación bivariada por medio de los coeficientes de correlación de Pearson y de Spearman, con significancia  $\alpha=0.05$  en prueba bilateral. Fueron consideradas como variable independiente la composición distinta de cada biomaterial y como variable dependiente la proliferación celular, la viabilidad relativa, el porcentaje de inhibición en el crecimiento celular y el grado de mineralización, según cada caso. Aquellos valores con  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Se emplea el programa SPSS Statistics 19.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Evaluación de los efectos inhibitorios sobre la proliferación celular de las células MC3T3-E1 de los compositos de PU/nHAP

#### 7.1.1 Cinética de crecimiento de la línea celular MC3T3-E1 subclona 4

Primeramente se llevó a cabo una cinética de crecimiento de las células MC3T3-E1 subclona 4, propagando a las células en medio MEM- $\alpha$  suplementado con 10% de SFB, sin ácido ascórbico, a 37°C en una atmosfera controlada con 5% de bióxido de carbono. Se determina la viabilidad y concentración celular (por tinción con Azul de tripano) cada 24 horas, hasta las 96 horas. Con los datos obtenidos se observó que, para mantener una viabilidad en los cultivos alrededor del 95% y en fase exponencial de crecimiento, habría que mantener una concentración celular entre 20 mil y 80 mil células/cm<sup>2</sup> y resemar cada 48 horas (Figura 2). En base a estos datos se establecieron las condiciones para los cultivos celulares de MC3T3-E1.

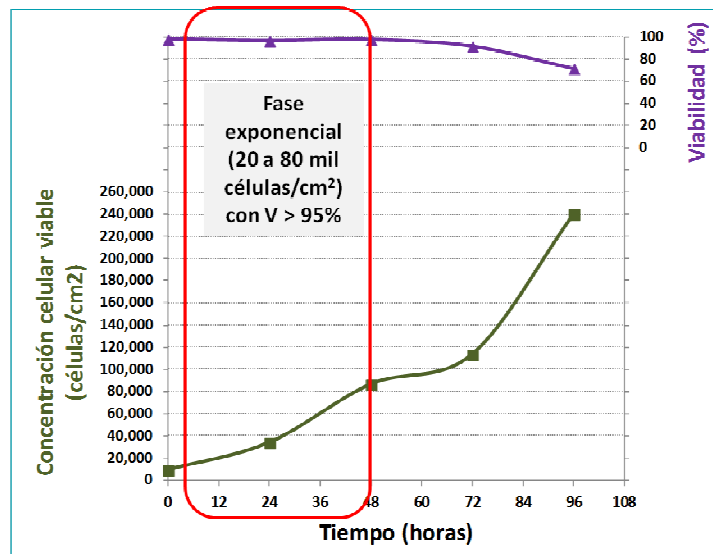


Figura 2. Cinética de crecimiento de la línea celular MC3T3-E1 subclona 4.

### **7.1.2 Proliferación y viabilidad celular en contacto con el biomaterial a distintas composiciones**

Previo a la inducción de la diferenciación celular en los cultivos, se les midió la concentración celular a las 24 y a las 48 horas, tiñendo con azul de tripano cada muestra para su conteo celular y se midió la viabilidad celular en los cultivos, determinada por el conteo de todas aquellas células que no se tiñeron de color azul (las células vivas), respecto al total de células, en todos ellos, ésta se encontró alrededor de un 99% de viabilidad.

De acuerdo a las concentraciones celulares determinadas en cada cultivo, en presencia del biomaterial, gráficamente se observa a las 24 horas ligeras diferencias entre los cultivos, debidas a la adaptación celular (fase lag). A las 48 horas, gráficamente se observa que podría existir cierta relación, entre la composición de nHAp en los biomateriales y la concentración celular, es decir, que el porcentaje de nHAp en la composición del biomaterial podría tener una relación directa con la proliferación celular (Figura 3).

Sin embargo, cabe aclarar que el objetivo de este ensayo fue, para monitorear la viabilidad y confluencia celular de los cultivos previo a la inducción de la diferenciación celular, ya que en este ensayo, la evaluación se hizo en las células en contacto con el biomaterial, pero adheridas a las placas de cultivo. Para la evaluación de la viabilidad celular, se obtuvieron datos más objetivos, a partir de las células en contacto directo exclusivamente con los distintos biomateriales, en el ensayo de azul de alamar, el cual trata a continuación.

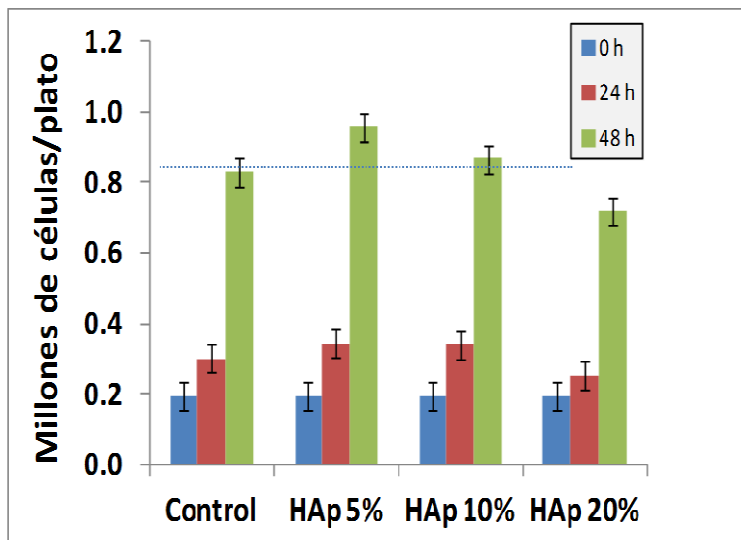


Figura 3. Proliferación celular en presencia del biomaterial a distintas composiciones.

### 7.1.3 Evaluación de la viabilidad/citotoxicidad por medio del ensayo de Azul de Alamar.

Siguiendo el protocolo para este ensayo que se mencionó con anterioridad, a las 24, 48 y 96 horas de la siembra, se midió la absorbancia de los cultivos en contacto con azul de alamar en presencia del biomaterial (PU, 5% nHAp, 10% nHAp y 20% nHAp), sin biomaterial (controles positivos), y cultivos control negativos (sin células, con y sin azul de alamar). Cada prueba se hizo por triplicado.

La viabilidad celular (expresada como el porcentaje de reducción de azul de alamar de la muestra entre el porcentaje de reducción de azul de alamar del control positivo) se puede apreciar en la figura 4. El día 1 se observa una fase de adaptación celular; el día 2 se observa la etapa de proliferación en todos los casos y el día 4 se observa se alcanza el estado estacionario. Como puede observarse, la viabilidad relativa o el LD50 de todos los biomateriales son mayores al 50%, considerando al cultivo control como el 100% de viabilidad celular. Dado que en los cultivos en contacto con las distintas

composiciones de biomaterial hay más de un 50% de la población de células vivas, se puede asegurar que ninguno de ellos es citotóxico.

Estadísticamente, al evaluar la correlación entre el porcentaje de nHAp (0, 5, 10 y 20%) en la composición del biomaterial (variable independiente) y la viabilidad celular (variable dependiente), al momento preciso de la fase de proliferación celular, es decir, al día 2, el coeficiente de correlación de Spearman (1.0) indica que sí existe correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre ambas variables; inclusive, a este tiempo, el coeficiente de correlación de Pearson (0.989) con una significancia  $p = 0.01$  indica también una correlación positiva, estadísticamente significativa, lo cual significaría que, a ese tiempo, al aumentar el porcentaje de nHAp, la viabilidad celular también aumenta. Lo anterior significa que, en la fase de proliferación celular en la curva del crecimiento celular, al día 2, el porcentaje de nHAp en la composición del material influye directamente sobre la viabilidad celular.

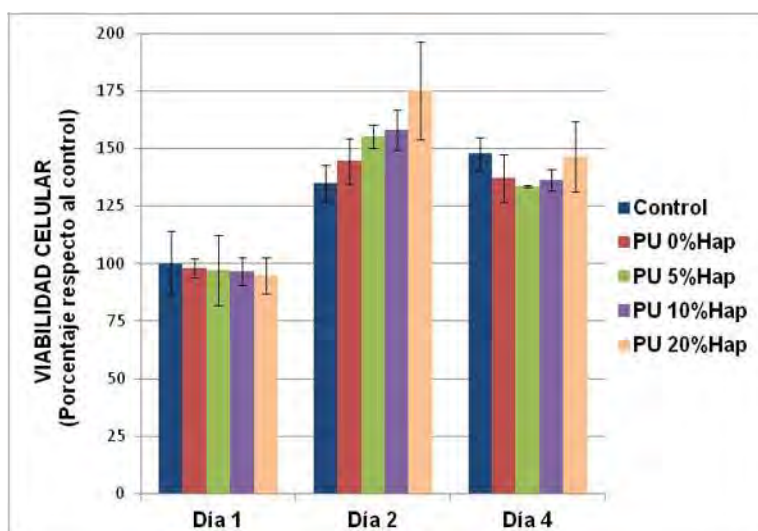


Figura 4. Viabilidad celular expresada como el porcentaje de células viables respecto al control del día 1 (células sin biomaterial). Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ).

Representado como el porcentaje de inhibición en el crecimiento celular respecto al porcentaje de nHAp en el biomaterial, los resultados mostrados en la tabla 1, indican, en la fase exponencial (día 2), una disminución en el porcentaje de inhibición en el crecimiento celular al aumentar el contenido de nHAp en los materiales. Los resultados indican que ningún biomaterial presenta efectos inhibitorios en el crecimiento celular, al contrario, presentan una estimulación en la proliferación celular y son congruentes a la viabilidad celular determinada y su relación con el contenido de nHAp en los biomateriales.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición en el crecimiento celular de los distintos biomateriales respecto al control. Evaluado por método de azul de alamar, el día 2.

<b>Biomaterial</b>	<b>Porcentaje de Inhibición en el crecimiento respecto al control</b>
PU/0% nHAp	-7.08
PU/5% nHAp	-14.96
PU/10% nHAp	-17.16
PU/20% nHAp	-29.65

## **7.2 Evaluación del grado de mineralización ósea sobre cada composito**

### **7.2.1. Evaluación por tinción histoquímica con rojo de Alizarina S**

De acuerdo al protocolo descrito, los cultivos en presencia de los distintos biomateriales y los cultivos control, con y sin ácido ascórbico, pasados 11 y 22 días de inducir la diferenciación celular por adición con ácido ascórbico, se tiñeron con rojo de alizarina S para revelar la presencia de matriz mineralizada por la tinción de los nódulos de calcio, cuya medición de la absorbancia a 415 nm es directamente proporcional a la cantidad de nódulos de calcio teñidos, lo cual nos permitió conocer el grado de

mineralización de cada cultivo en presencia del biomaterial al compararlo con un cultivo control, sin biomaterial, es decir, la mineralización relativa. Gráficamente, los resultados obtenidos a los 11 días, en aquellos cultivos en los cuales no se indujo la diferenciación celular por adición de ácido ascórbico (Figura 5), sugieren que la presencia del biomaterial con 10 y 20% de nHAp podría ser más favorable para la formación de matriz mineralizada. En aquellos cultivos en los que se adicionó ácido ascórbico, los resultados sugieren que la presencia del biomaterial con 5 y 10% de nHAp podrían estimular más el proceso de mineralización, aunque el biomaterial con 20% de nHAp se comporta como el control positivo (cultivo sin biomaterial pero con inducción osteogénica por ácido ascórbico), lo cual implica que se da de manera similar el proceso de mineralización en estos dos últimos.

Estadísticamente, en los cultivos en ausencia de ácido ascórbico se obtiene un coeficiente de correlación de Spearman de 1.0 y una significancia  $p < 0.05$ ; inclusive el coeficiente de correlación de Pearson (0.999) con una significancia  $p = 0.035$ ; lo cual indica que existe una fuerte correlación positiva, estadísticamente significativa, entre la composición del biomaterial y el grado de mineralización. En presencia de ácido ascórbico, se obtiene un coeficiente de correlación de Spearman de -1.0, con una significancia  $p < 0.05$ , lo cual significa que existe correlación negativa significativa, aunque no necesariamente lineal, entre ambas variables.

En la evaluación del grado de mineralización al día 22, posterior a la inducción de la diferenciación, en aquellos cultivos a los cuales no se adicionó ácido ascórbico, se puede apreciar gráficamente que la mineralización inducida por cada material se mantuvo sin diferencias visibles entre los diferentes cultivos (Figura 6), sin embargo, en aquellos cultivos con ácido ascórbico, la presencia del biomaterial al 5 y 10% de nHAp propició un mayor grado de mineralización, en comparación al cultivo control.

El análisis estadístico de la correlación entre la composición del biomaterial y el grado de mineralización, indica, tanto en presencia como en ausencia de ácido ascórbico, que sólo existe una

correlación débil, no significativa, entre ambas variables y que esta correlación no es lineal (Coeficiente de correlación de Spearman= -0.500, con una significancia p=0.667, en ambos casos).

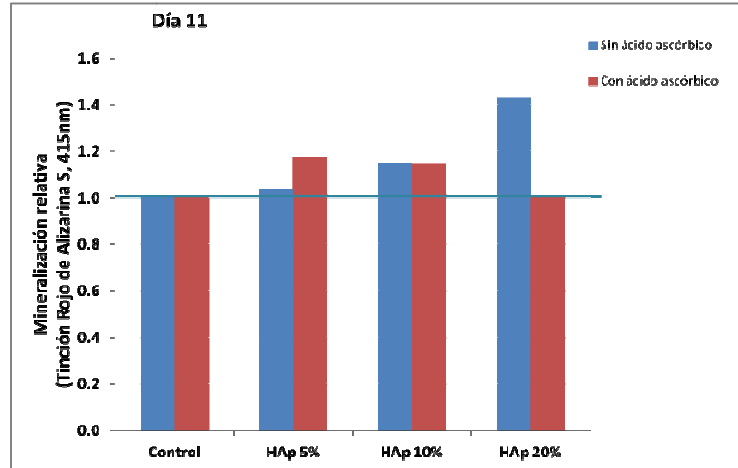


Figura 5. Grado de mineralización ósea relativa (muestra/control) de los cultivos en presencia del biomaterial a los 11 días, con y sin inducción a la diferenciación celular por ácido ascórbico. Tinción con rojo de alizarina S. Lecturas de absorbancia a 415 nm.

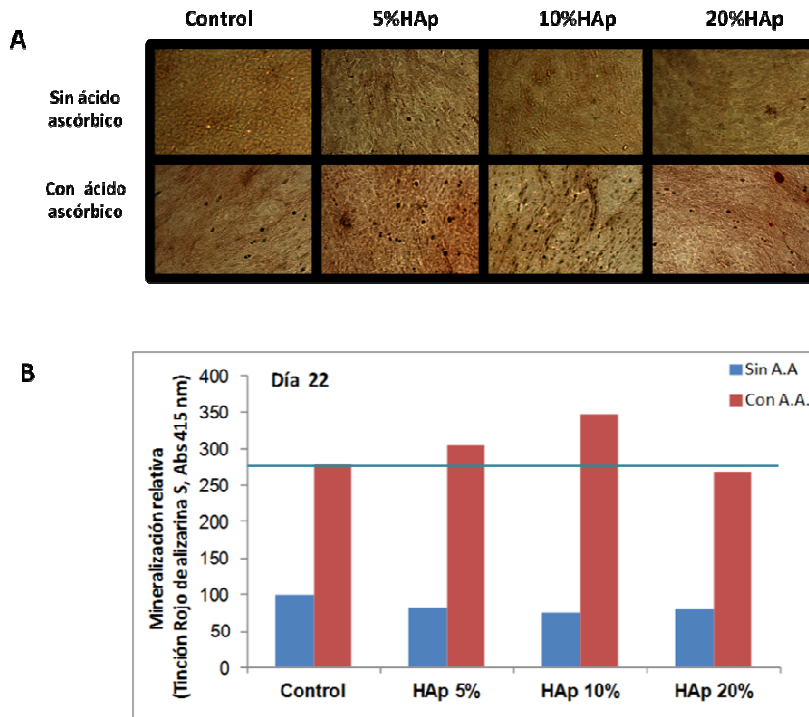


Figura 6. Grado de mineralización ósea relativa (muestra/control) a los 22 días, con y sin de inducción de la diferenciación celular por ácido ascórbico. (A) Imágenes en microscopio de luz invertida (LEICA) a un aumento 100X de los cultivos celulares en presencia del biomaterial en sus distintas composiciones teñido por Rojo de alizarina S. Los nódulos de calcio se muestran como pequeños puntos de color rojo o negro. (B) Gráfico mineralización relativa a partir de las lecturas de absorbancia a 415 nm de las muestras teñidas con rojo de alizarina S.

### **7.3 Evaluación por espectroscopía de energía dispersiva (EDS) de la adherencia, proliferación celular y del grado de mineralización ósea**

Las imágenes del MEB a 1000X de las distintas composiciones del biomaterial, antes y después de 10 días de cultivo en presencia de ácido ascórbico (Figuras 8 a 10), comparadas con las micrográficas de los biomateriales en ausencia de células (Figura 7), muestran la presencia de matriz extracelular formada y deposición de nódulos de calcio sobre los biomateriales bajo condiciones de cultivo y se confirma su presencia por el análisis de composición elemental por EDS (Figura 11). Los materiales en ausencia de células presentaron una relación de Ca/P de 1.95, y en presencia de células fue del 2.22 con nHAp al 5%, 2.49 con nHAp al 10% y 2.40 con nHAp al 20%, confirmando la deposición de calcio en los cultivos con células, es decir, la formación de una matriz mineralizada y por lo tanto, un mayor grado de mineralización en los biomateriales con células adheridas.

Respecto al carbono, su contenido fue similar en las tres composiciones en ausencia de células. En contraste, bajo condiciones de cultivo, se observó la adherencia y diferenciación de células sobre la superficie del biomaterial, confirmado por un considerable aumento en el contenido de carbono respecto al biomaterial en ausencia de células: 6 veces más en nHAp al 5%, 8.3 veces más en nHAp al 10% y 2.5 veces más en nHAp al 20%.

Estos resultados por EDS muestran visualmente que el composito al 10% de nHAp presentó un mayor grado de adherencia, proliferación y diferenciación celular sobre su superficie, verificable por el mayor aumento en el contenido de carbono, y por la relación Ca/P mayor en este composito, y el grado de mineralización fue mayor en este biomaterial comparado con los otros compositos.

El análisis estadístico de este ensayo respecto a la correlación entre el contenido de carbono sobre la superficie de los biomateriales en condiciones de cultivo y el porcentaje de nHAp de cada uno de ellos, indica de acuerdo al coeficiente de correlación de Spearman (-0.500) con una significancia

$p=0.667$ , que existe una débil correlación (no precisamente lineal) y no estadísticamente significativa, entre los biomateriales y el carbono sobre la superficie. Respecto a la relación de Ca/P sobre la superficie de los biomateriales, el coeficiente de correlación de Spearman (0.500) con una significancia  $p=0.667$  indica que existe sólo una débil correlación, no estadísticamente significativa, entre el contenido de Ca/P sobre la superficie y la concentración de nHAp de cada biomaterial.

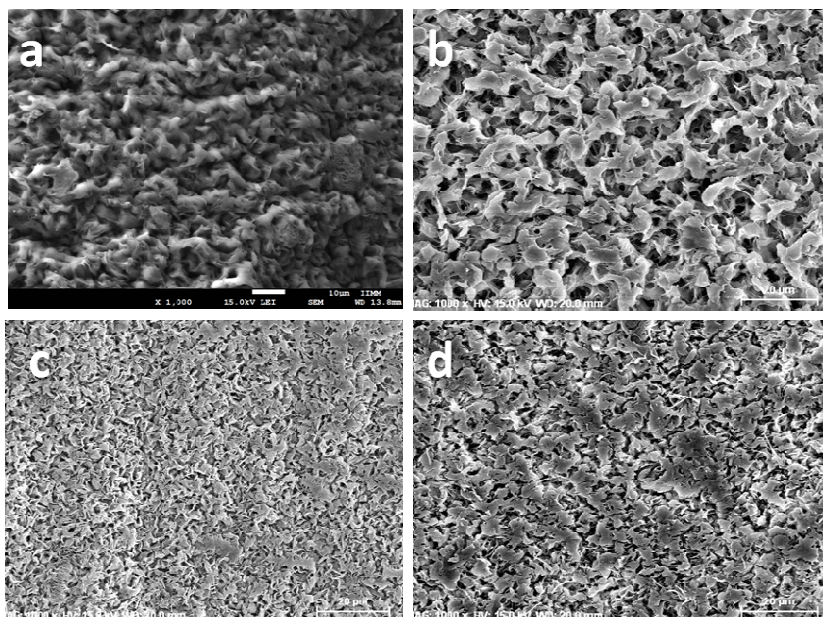


Figura 7. Micrografías del MEB del biomaterial en ausencia de células, 1000X: a) PU/0% nHAp, b) PU/5% nHAp, c) PU/10% nHAp y d) PU/20% nHAp.

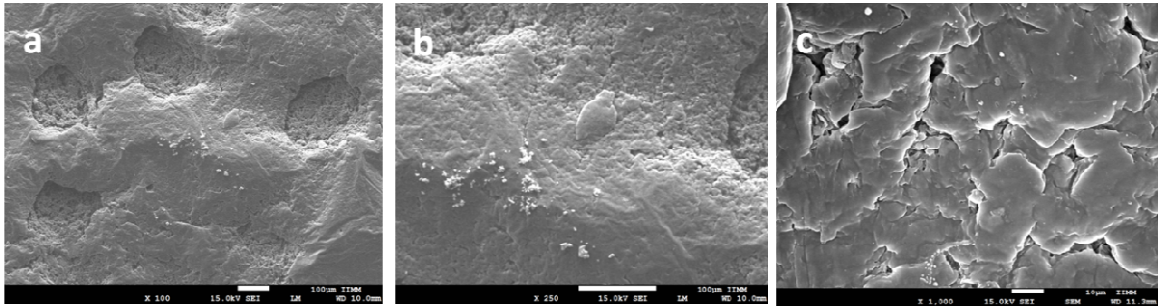


Figura 8. Micrografías del MEB del biomaterial al 5% de nHAp con células al día 10 en presencia de ácido ascórbico, a) 100X, b) 250X y c) 1000X.

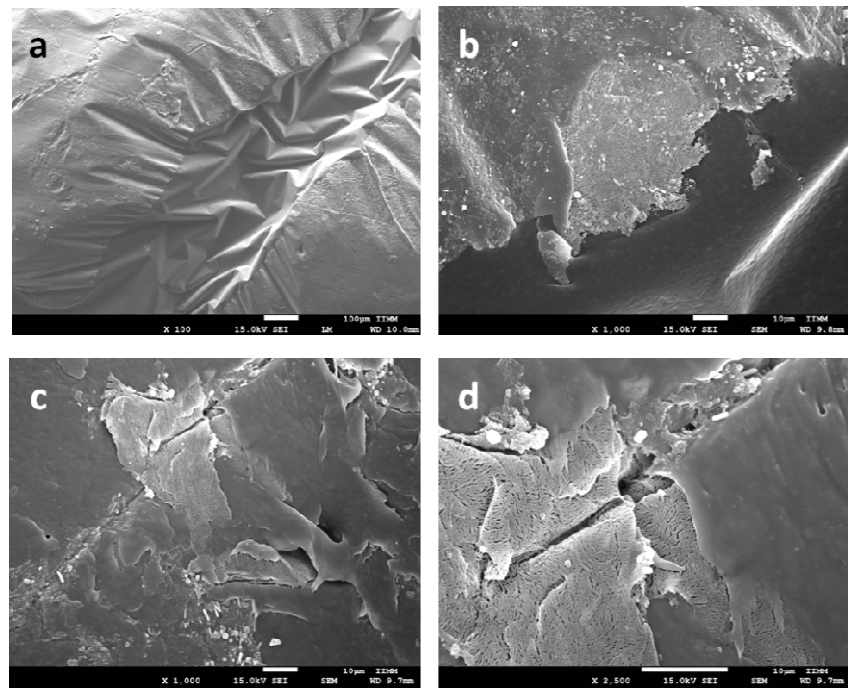


Figura 9. Micrografías del MEB del biomaterial al 10% de nHAp con células al día 10 en presencia de ácido ascórbico, a) 100X, b) 1000X, c) 1000X y d) 2500X.

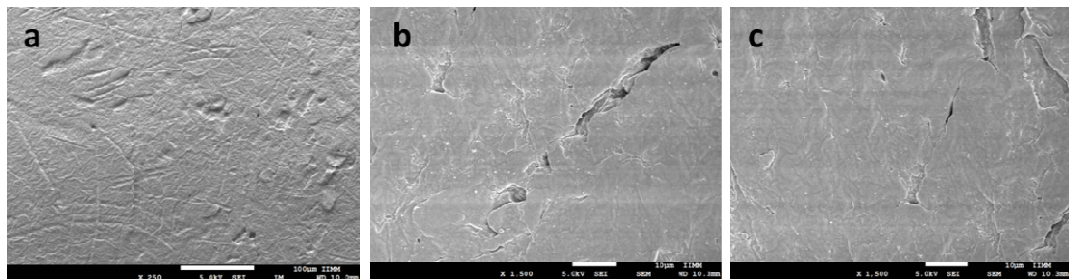


Figura 10. Micrografías del MEB del biomaterial al 20% de nHAp con células al día 10 en presencia de ácido ascórbico, a) 250X, b) 1500X y c) 1500X.

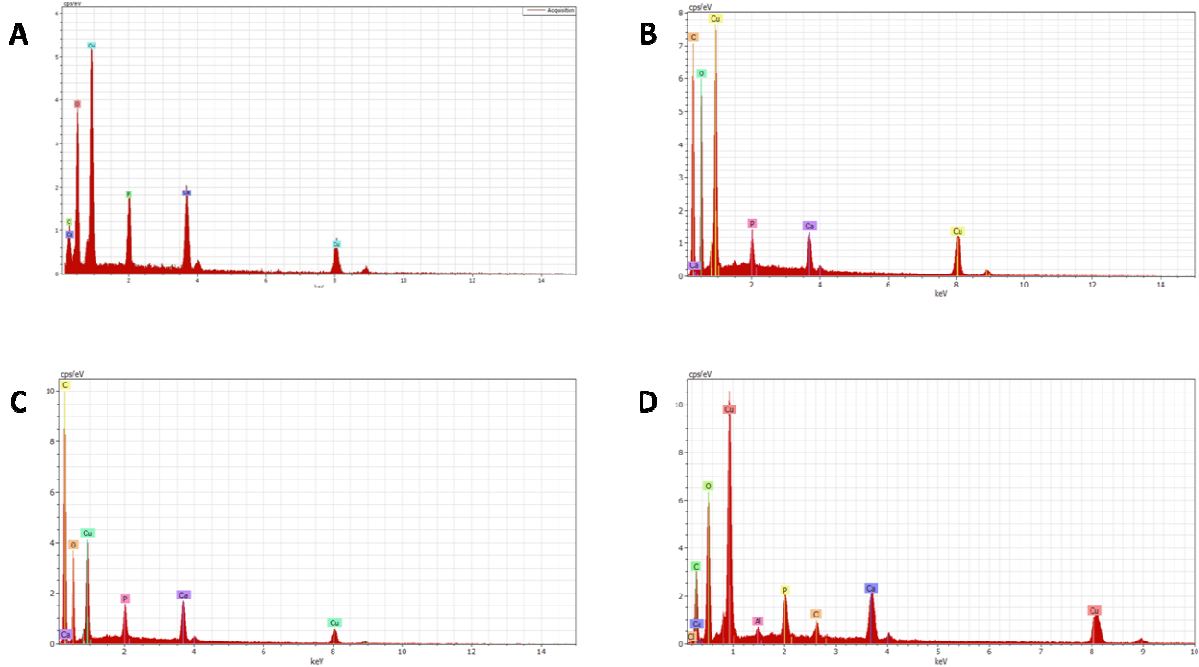


Figura 11. Análisis EDS del biomaterial: A) PU/ nHAp al 10% en ausencia de células, B) PU/ nHAp al 5%, 10 días después del cultivo en presencia de ácido ascórbico, C) PU/ nHAp al 10% a 10 días del cultivo celular en presencia de ácido ascórbico, D) PU/ nHAp al 20% 10 días después del cultivo en presencia de ácido ascórbico.

## 7.4 Evaluación de los marcadores osteogénicos

### 7.4.1 Diseño de primers

Para la elección de los cebadores se hizo una revisión bibliográfica de las secuencias utilizadas por otros grupos de investigación (Arnsdorf *et al.*, 2010; Chuenjitkuntaworn *et al.*, 2010; Monjo *et al.*, 2012; Munarin *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012; Yazid *et al.*, 2010), se compararon con las secuencias de ARNm reportadas en el banco genómico de la NCBI (National Center for Biotechnology Information), se analizaron con el programa OligoAnalyzer 3.1 ([www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/](http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/)) donde se verificó el correcto diseño de los cebadores; es decir, complementariedad del 100%, que no iniciaran con A o T, y que su temperatura

de alineamiento ( $T_m$ ) estuviese entre 55 y 60 °C +/- 5°C y fuera próxima entre ambos cebadores, que el contenido de GC fuera entre el 40 y 60%, que la longitud de cada primer fuera entre 18 y 30 bases y que existiera baja probabilidad de formación de estructuras secundarias. Finalmente, los primers seleccionados se analizaron con programa "Oligo-Blast" del "NCBI" para verificar que fueran específicos sólo al gen de interés. Las secuencias de los distintos cebadores se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Cebadores específicos para los marcadores osteogénicos a evaluar. *Mus musculus*: COLLA1, colágeno tipo I alfa 1; OCN, osteocalcina; OTX, osterix (C22); BSP, sialoproteína ósea; GAPDH, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

Pares de primers específicos para cada marcador osteogénico usados en la RT-PCR						
Identificador NCBI (GI)	Gen	Sentido del cebador	Secuencia 5'- 3'	$T_m$ °C	% GC	Tamaño del fragmento esperado (pb)
118131144	COLLA1	Forward	CAA TGG TGC TCC TGG TAT TG	58.8	50.00	144
		Reverse	GCA CCA GTG TCT CCT TTG TT	60.7	50.00	
455456	OCN	Forward	GCT CTG TCT CTC TGA CCT CA	60.5	55.00	184
		Reverse	GTC ACA AGC AGG GTT AAG CTC	61.2	52.38	
18138080	OTX	Forward	CCA TCT GCC TGA CTC CTT	58.8	55.56	191
		Reverse	GTC AGC GTA TGG CTT CTT TG	59.2	50.00	
309321	BSP	Forward	CAG GGA GGC AGT GAC TCT TCA	64.52	57.14	159 pb
		Reverse	GAG TGT GGA AAG TGT GGC GTT	62.57	52.38	
126012538	GAPDH	Forward	CTG GCA TTG CTC TCA ATG ACA AC	62.4	47.83	201
		Reverse	GTG AGG GAG ATG CTC AGT GT	61.5	55.00	

#### 7.4.2 Evaluación de marcadores osteogénicos por PCR y electroforesis

La PCR es un proceso exponencial donde la cantidad de producto aumenta exponencialmente. En un momento determinado, denominado fase de meseta, la tasa de producción se desacelera y el

producto PCR aumenta a un ritmo desconocido. Después que se ha alcanzado este punto, la concentración inicial de ADN diana no puede determinarse por extrapolación. En otras palabras, incluso muy pequeñas diferencias en el inicio del proceso de amplificación tendrán un gran efecto en la cantidad de producto acumulado después de un número limitado de ciclos (Breljak *et al.*, 2005).

Es por esta razón que, el requisito para que la PCR pueda ser utilizada para cuantificar el producto PCR es que sea medido en la fase exponencial de la reacción de PCR, donde la cantidad de ADN amplificado es directamente proporcional a la cantidad de ADN inicial. Por lo tanto, la cuantificación de la expresión de los genes por RT-PCR semi-cuantitativa deberá ser durante la fase exponencial (log) de la reacción PCR, y la fase *plateau* o meseta deberá evitarse. La fase exponencial de la reacción de PCR puede ser determinada empíricamente por amplificación de cantidades equivalentes de ADNc a diferente número de ciclos de PCR (Breljak *et al.*, 2005).

Tomando en consideración esto, en este trabajo se realizó un análisis cinético por amplificación de producto PCR a diferente número de ciclos, lo cual nos mostró el rango de ciclos entre los que se encontraba la fase exponencial de la PCR. Posteriormente, se hizo un análisis más fino entre el rango de ciclos dado, para finalmente determinar el número de ciclos de la reacción de PCR más conveniente para cada gen.

Inicialmente se llevó a cabo la amplificación de todos los genes en las muestras tomadas cada dos días, tanto aquellas inducidas a la diferenciación por adición de ácido ascórbico como aquellas a las que no se les adicionó éste, se llevó a cabo por PCR de punto final a 35 ciclos de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, los resultados obtenidos de estas pruebas fueron aprovechados, a partir de las densidades ópticas de las bandas obtenidas de las distintas muestras de cada gen, se decidió utilizar las muestras con mayor concentración de producto de PCR (Figura 12) para posteriormente llevar a cabo la

afinación de los ciclos requeridos para modificar la PCR de punto final a una PCR semi-cuantitativa, en la cual los ciclos deberían encontrarse en la fase exponencial del proceso PCR y no en la fase de meseta, como en una PCR de punto final.

Para ello, con cada gen, se hizo una serie de PCRs a distintos ciclos dentro de un rango amplio, de 15 a 35 ciclos, en base a estos resultados se vio entre qué ciclos no se encontraba la fase meseta y posteriormente se hizo un análisis más detallado, dentro de un rango de ciclos más estrecho, para determinar de manera más precisa los ciclos en los cuales se encontraba la fase exponencial de la PCR (Figuras 13 y 14). Después de varios ensayos a distintos ciclos dentro de la fase exponencial, se decidió por una PCR a 25 ciclos para GAPDH y para el resto de genes por 35 ciclos, por ser ciclos en los cuales se podría encontrar la mayor cantidad de producto, sin llegar aún a la fase de meseta de la PCR y en los cuales se podría emplear un volumen razonable de producto PCR en electroforesis y habría congruencia entre el volumen empleado y la densidad óptica leída de cada banda.

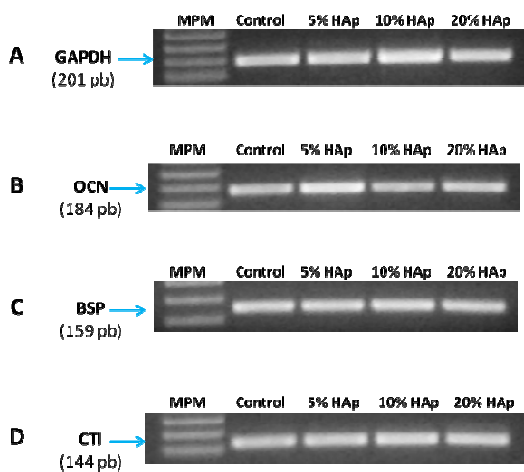


Figura 12. PCR's de punto final utilizadas para ajustar ciclos para PCR semi-cuantitativa: Control GAPDH día 6 sin ácido ascórbico (A), Control OCN día 6 con ácido ascórbico (B), Control BSP día 6 con ácido ascórbico (C), Control CTI día 6 con ácido ascórbico (D).

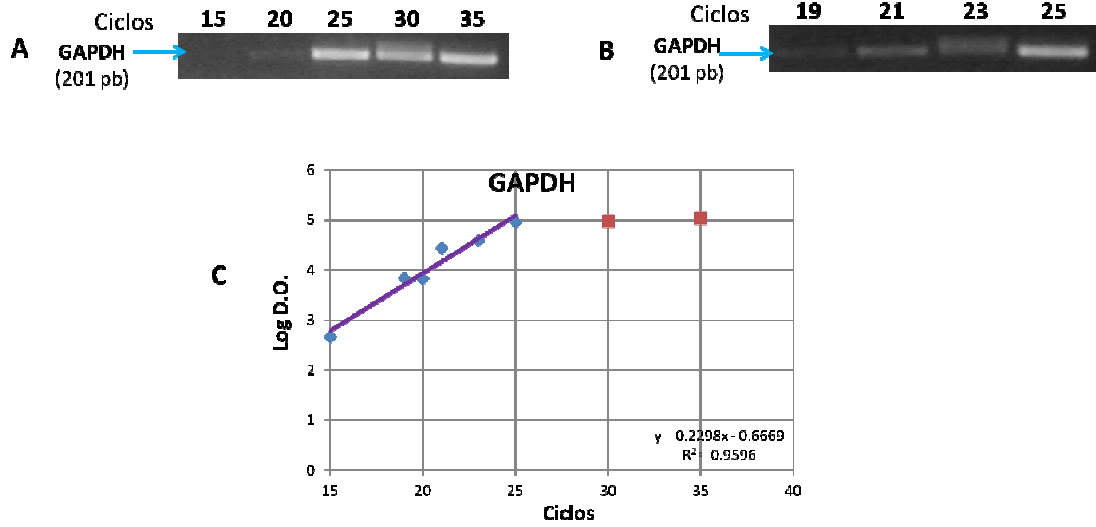


Figura 13. Ajuste de ciclos de GAPDH para PCR semi-cuantitativa. (A) Ensayos de 15, 20, 25, 30 y 35 ciclos de PCR. (B) Ensayos a 19, 21, 23 y 25 ciclos. (C) Gráfico de la fase exponencial y meseta de acuerdo a los ciclos evaluados.

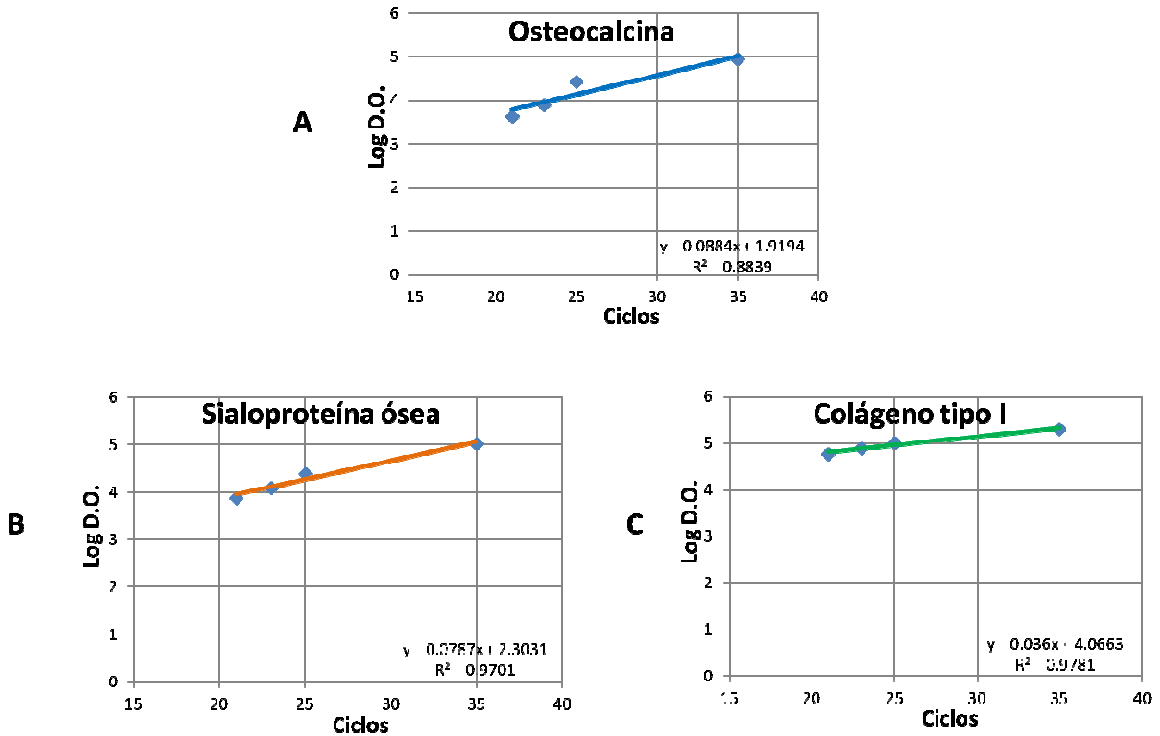


Figura 14. Ajuste de ciclos para PCR semi-cuantitativa: (A) Osteocalcina, (B) Sialoproteína ósea, (C) Colágeno tipo I.

Una vez estandarizadas las condiciones para la PCR semi-cuantitativa, se llevaron a cabo nuevas PCR para la evaluación de cada uno de los marcadores osteogénicos de nuestro interés, con el objetivo de evaluar el fenotipo osteoblástico de la línea celular después de la inducción con ácido ascórbico (cultivo control sin biomaterial y en medio osteogénico). La evaluación de la expresión de cada gen, mediante el análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel, se muestra en las figuras 15, 16 y 17. Estos resultados corresponden a cultivos control (sin biomaterial) en medio osteogénico.

Analizando la expresión de osteocalcina en los días 1, 5, 7 y 14, se observa visualmente, que la expresión relativa a lo largo de los días aumenta paulatinamente (figura 15), del día 1 al 5 ésta aumenta alrededor de 2000 veces, al día 7 alrededor de 2800 veces se ve aumentada la expresión y al día 14, la expresión aumenta alrededor de 6900 veces, respecto al día 1 cuyo valor de expresión es considerado igual a 1.

La expresión relativa del colágeno tipo I, a lo largo del tiempo, por el contrario parece disminuir conforme avanzan los días (figura 16); en el día 1 ésta se encuentra alrededor de 2 veces aumentada respecto al día 14 (día de menor expresión relativa, cuyo valor de expresión es considerado igual a 1), en el día 5 la expresión se mantiene casi constante (2.24 veces más respecto al día 14), y el día 7 ésta disminuye a 1.43 veces respecto al día 14.

Respecto a la expresión relativa de osterix, se observa gráficamente que ésta se mantiene aproximadamente constante, con una ligera disminución de la expresión al día 14 (figura 17); respecto al día 14 (día de menor expresión del gen, cuyo valor de expresión es considerado igual a 1), el día 1 se encuentra aumentado 1.8 veces, el día 5 aumentada 2.03 veces y el día 7 aumentada 1.82 veces.

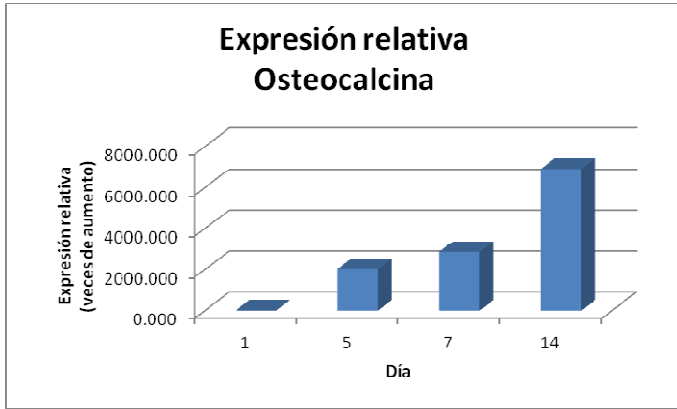


Figura 15. Expresión relativa de la Osteocalcina (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo) en cultivos control (sin biomaterial). Análisis de producto de PCR por electroforesis.

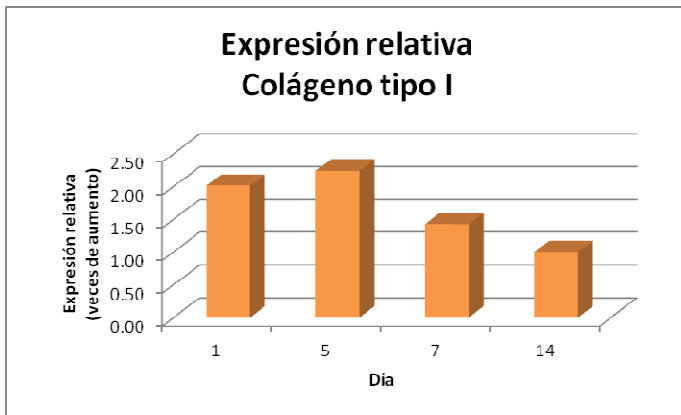


Figura 16. Expresión relativa del Colágeno tipo I (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo) en cultivos control (sin biomaterial). Análisis de producto de PCR por electroforesis.

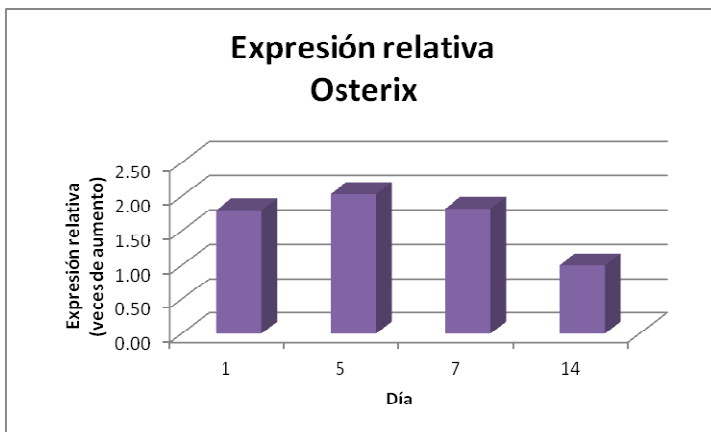


Figura 17. Expresión relativa de Osterix (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo) en cultivos control (sin biomaterial). Análisis de producto de PCR por electroforesis.

Se llevó a cabo un ensayo para evaluar la expresión de estos genes en los cultivos en contacto con los distintos biomateriales; los resultados se muestra en las figuras 18, 19 y 20. Cabe mencionar que los cultivos en contacto con los biomateriales, en este caso, se encontraban en medio MEM- $\alpha$  sin ácido ascórbico y se comparan con el cultivo control (sin biomaterial y en medio osteogénico, es decir, con ácido ascórbico). En el caso de la osteocalcina (figura 18), al día 6, se puede observar el aumento en la expresión del gen al contacto de las células con los biomateriales, aún sin el estímulo de un medio osteogénico, alrededor de 1.3 veces más en los biomateriales con 5 y 10% de nHAp y un incremento en la expresión de 1.64 veces en el biomaterial con 20% de nHAp, respecto al control. Al día 10, la expresión del gen en los cultivos con los biomateriales PU/nHAp fue muy parecida en los tres y, comparada con la expresión en el cultivo control, ésta disminuyó casi por la mitad en los cultivos con los tres biomateriales. Al evaluar estadísticamente la correlación entre la composición de nHAp del biomaterial (variable independiente) y la expresión del gen (variable dependiente), al día 6, existe una fuerte correlación positiva, estadísticamente significativa (Coeficiente de correlación de Pearson=0.983, con una significancia  $p=0.037$ ) entre ambas variables, es decir, que el porcentaje de nHAp en el biomaterial influyó directamente en la expresión del gen. Al día 10, la evaluación de la correlación entre las mismas variables arrojó un dato de correlación estadísticamente no significativo.

Respecto al colágeno tipo I (figura 19), al día 6, la expresión del gen fue similar en los tres biomateriales, disminuida la expresión casi a la mitad respecto al cultivo control, mostrando menos disminución el cultivo con el composito PU/nHAp al 5%. Al día 10, la expresión en el cultivo en contacto con el biomaterial con 5% de nHAp aumentó 1.41 veces y con los otros biomateriales la expresión disminuyó a aproximadamente la mitad, comparados con el cultivo control. Estadísticamente, en la evaluación de la correlación entre el porcentaje de nHAp en el biomaterial y la expresión del gen, esta correlación resultó no significativa estadísticamente.

Respecto a osterix (figura 20), al día 6, la expresión fue similar en todos los cultivos, comparados con el control. Sin embargo, al día 10, se observa claramente cómo los tres biomateriales estimularon la expresión del gen alrededor de 5.75 veces más el compuesto PU/nHAp al 5%, 4.73 veces más el compuesto PU/nHAp al 20% y, el compuesto al 10% aumentó la expresión del gen 6.25 veces más, comparados con el control. En la evaluación de la correlación entre la composición de nHAp del biomaterial y la expresión del gen, no existe una correlación significativa.

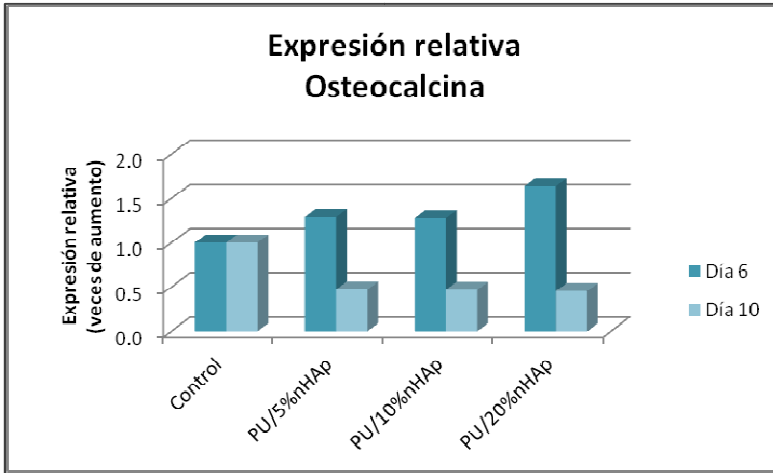


Figura 18. Expresión relativa de Osteocalcina a GAPDH (veces de aumento respecto al cultivo control (sin biomaterial y en medio osteogénico) en cultivos celulares en contacto con el biomaterial. Análisis de producto de PCR por electroforesis.

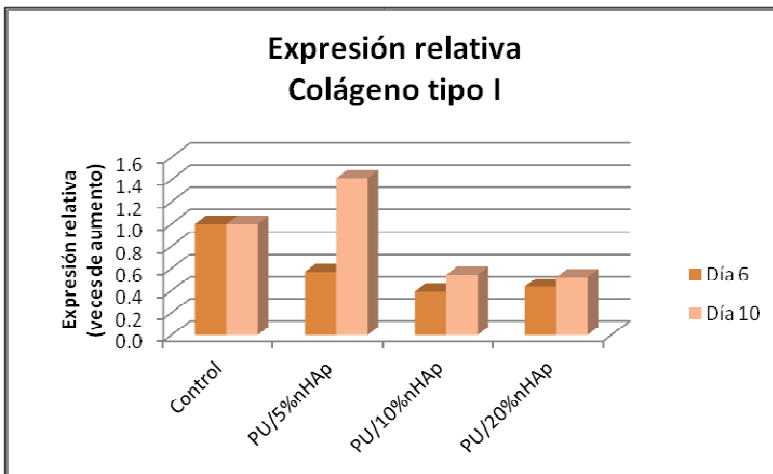


Figura 19. Expresión relativa de Colágeno tipo I a GAPDH (veces de aumento respecto al cultivo control (sin biomaterial y en medio osteogénico) en cultivos celulares en contacto con el biomaterial. Análisis de producto de PCR por electroforesis.

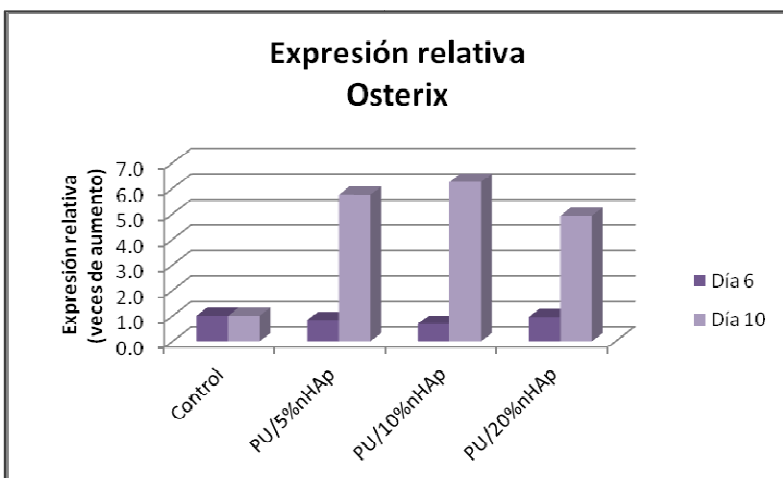


Figura 20. Expresión relativa de Osterix a GAPDH (veces de aumento respecto al cultivo control (sin biomaterial y en medio osteogénico) en cultivos celulares en contacto con el biomaterial. Análisis de producto de PCR por electroforesis.

#### 7.4.3 Evaluación de los marcadores osteogénicos por PCR y tinción con Azul de Toluidina (TBO)

Los productos de PCR también fueron analizados por la técnica de espectrofotometría y tinción con TBO, para ello se siguió el protocolo ya descrito en “Materiales y métodos”, donde de acuerdo al gráfico obtenido (Figura 1) y a la ecuación de la recta de éste:

$y = -11.044x + 0.088$ , donde  $y = \mu\text{g DNA/mL TBO}$  y  $x = \Delta \text{Abs} = \text{Abs a } 628 \text{ nm de la muestra} - \text{Abs a } 628 \text{ nm de TBO puro}$ , fue posible determinar las concentraciones de DNA de las muestras de PCR.

Se evaluó la expresión de varias muestras por este método, entre ellas se mencionan dos ejemplos. Uno fue la evaluación de la expresión del colágeno tipo I en cultivos control de los días 1, 5, 7 y 14 (figura 21), en la cual se vio que la expresión del gen disminuyó a lo largo de los días, respecto a la expresión del día 14 (el día de la expresión más baja, cuyo valor de expresión es considerado igual a 1), el día 1 se encontró aumentada 3.01 veces más, el día 5 aumentada 1.78 veces y el día 7 aumentada 1.15 veces. Datos que concuerdan con los obtenidos por el método de electroforesis en

gel en la evaluación del mismo gen (figura 16), en los mismos días y condiciones, en ambas técnicas la expresión del gen disminuye a lo largo del tiempo.

Otro ejemplo llevado a cabo por el método TBO fue la evaluación de la expresión de osterix (figura 22) en cultivos control a los días 1, 5, 7 y 14, aquí se vio que la expresión relativa del gen a lo largo del tiempo, respecto al día 14 (día de menor expresión del gen, cuyo valor de expresión es considerado igual a 1), el día 1 se vio 1.63 veces aumentada, el día 5 aumentada 1.22 veces y el día 7 aumentada 1.39 veces, es decir, la expresión se mantuvo aproximadamente constante a lo largo del tiempo, ligeramente menos expresado al día 14. El perfil de expresión del gen obtenido por este método, también resultó similar al obtenido por el método de electroforesis en gel, respecto al mismo gen, en las mismas condiciones y días (figura 17).

Se pudo ver que este método es muy preciso y podría ahorrar tiempo en las determinaciones, sin embargo, se pretende ajustar detalles técnicos en el uso de esta técnica y emplearla en futuros ensayos. De momento, en este proyecto, los resultados de expresión génica sólo se basaron en los datos obtenidos por el método de electroforesis en gel.

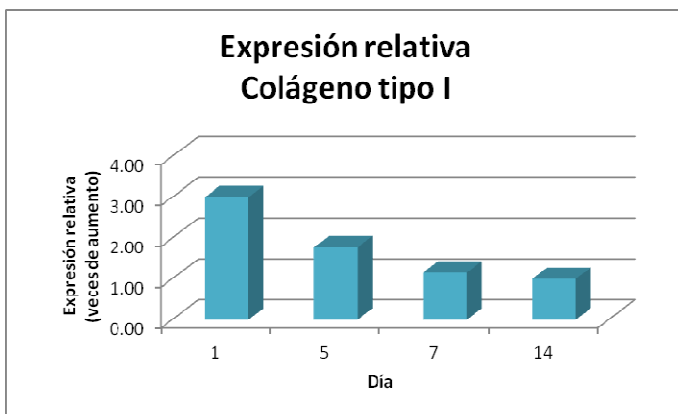


Figura 21. Expresión relativa de Colágeno tipo I (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo). Análisis de producto de PCR por espectrofotometría y tinción con azul de toluidina.

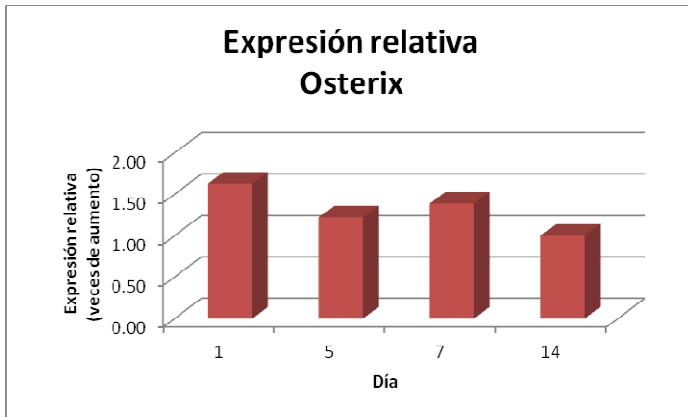


Figura 22. Expresión relativa de Osterix (veces de aumento respecto al valor gen/GAPDH más bajo). Análisis de producto de PCR por espectrofotometría y tinción con azul de toluidina.

## 8. DISCUSIÓN

Por medio del ensayo de azul de alamar se evaluó la viabilidad celular relativa, entendida como el porcentaje de reducción de azul de alamar de la muestra respecto al control positivo, donde éste último representa al 100% de la población y la viabilidad celular relativa de una muestra representa al porcentaje de células vivas en ésta, valor que mientras sea mayor al 50% significaría que el material evaluado no es citotóxico a dicha población celular. Los datos obtenidos con todos los biomateriales evaluados arrojaron una viabilidad celular relativa mayor al 50%, lo cual significa que, ninguno de ellos es citotóxico. Un dato más nos dice que, en relación a los materiales con distintos porcentajes de nHAp y el PU, éste último presenta una viabilidad relativa menor, es decir, que la viabilidad celular en los cultivos en contacto con los biomateriales de PU/nHAp mejoró respecto al PU puro. Los resultados gráficos (figura 4) muestran la viabilidad celular a lo largo de cuatro días, pero también muestran el perfil de una curva de crecimiento celular, en la cual al día 1, las células presentan una etapa de adaptación (fase lag). Posteriormente, al día 2, inicia la fase de proliferación, fase exponencial en la cual es posible observar la influencia del biomaterial sobre las células, a este tiempo; el análisis estadístico de la correlación entre el porcentaje de nHAp del biomaterial y la viabilidad celular emitió un coeficiente de correlación de Spearman de 1.0 con una  $p < 0.01$ ; inclusive, a este tiempo, el coeficiente de correlación de Pearson (0.989) presentó una significancia  $p = 0.01$ ; éstos datos indican que existe una fuerte correlación positiva, estadísticamente significativa entre ambas variables, es decir, que al aumentar el porcentaje de nHAp, la viabilidad celular también aumenta. Al día 4, es posible observar la fase estacionaria de una curva de crecimiento celular, en la cual la proliferación celular se mantiene en equilibrio entre la vida y muerte de la población, en esta etapa, estadísticamente, no existe correlación significativa entre la composición del biomaterial y la viabilidad.

Los resultados del mismo ensayo, representados como inhibición en el crecimiento celular respecto al porcentaje de nHAp en los distintos biomateriales, y comparados con el cultivo control, indican, en la fase exponencial (día 2), una disminución en el porcentaje de inhibición en el crecimiento a medida que aumenta el porcentaje de nHAp en los biomateriales, resultados que son congruentes con la viabilidad celular relativa determinada en los mismos biomateriales, y de igual manera, con relación a los materiales con distintos porcentajes de nHAp y el PU puro, este último presentó un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento celular. Ambos resultados dados por este ensayo, muestran al comparar al PU puro con los distintos materiales compuestos por PU/nHAp, que al adicionar a la hidroxiapatita al PU, la respuesta celular mejoró, demostrada por una mayor adhesión y proliferación celular sobre los biomateriales, reflejada por una mayor viabilidad y menor inhibición en el crecimiento celular. Lo anterior, concuerda con previos estudios en los cuales ya se había demostrado el mejoramiento de la capacidad proliferativa del PU al incorporar HAp en su composición (Chen *et al.*, 2012; Chuenjittkuntaworn *et al.*, 2010; Lui *et al.*, 2009).

Respecto al grado de mineralización inducido por los distintos biomateriales, evaluado por tinción histoquímica con rojo de alizarina S, al día 22 posterior a la adición de ácido ascórbico, los cultivos tanto en presencia como ausencia de éste, estadísticamente no presentaron diferencias significativas en la correlación entre el contenido de nHAp del biomaterial y el grado de mineralización. Al día 11, posterior a la adición de ácido ascórbico, en los cultivos en presencia de ácido ascórbico, existe una correlación entre ambas variables, estadísticamente significativa, aunque no precisamente lineal; sin embargo, en el mismo tiempo, en los cultivos en ausencia de ácido ascórbico, se observó que existe una clara correlación lineal positiva, estadísticamente significativa, entre el contenido de nHAp de los biomateriales y el grado de mineralización, es decir, que al aumentar el porcentaje de nHAp en la

composición del biomaterial, el grado de mineralización también aumentó, y en este caso, los biomateriales al 10 y 20% de nHAp inducen una mayor mineralización. Este último dato es importante, ya que indica que, a pesar de no contener ácido ascórbico el cultivo y en condiciones *in vitro*, el biomaterial por sí solo es capaz de inducir la adhesión, proliferación y posterior mineralización del tejido neoformado, es decir, confirma las propiedades osteoinductivas y osteoconductoras del compuesto PU/nHAp.

Varios estudios muestran al comparar andamios de un polímero puro con andamios compuestos por ese mismo polímero y distinto contenido de HAp, que la capacidad osteoinductiva, la absorción de agua en la superficie y el grado de inducción de la mineralización de los compuestos mejoró a medida que el contenido de HAp aumentó en los andamios (Chuenjitkuntaworn *et al.*, 2010; Asefnejad *et al.*, 2015). Esta información concuerda con el comportamiento celular observado en los ensayos de este proyecto respecto a viabilidad celular y el grado de mineralización inducido por los distintos biomateriales, los cuales propiciaron un mayor estímulo a medida que el contenido de nHAp aumentó hasta un 20%. En el proceso de caracterización de distintos híbridos de PU/nHAp (al 0, 10, 20, 30 y 40% de nHAp en peso), Martínez y col. (2011), muestra que la capacidad hidrófila de los híbridos aumenta al incrementar el contenido de nHAp en los compuestos, pero que la mayor estabilidad térmica la presentaron los biomateriales al 10 y 20% de nHAp, ya que los compuestos al 30 y 40% de nHAp presentaron mayor inestabilidad térmica, lo anterior, sugiere que hasta un 20% en contenido de nHAp en un biomaterial podría ser favorable para sus propiedades como sustituto óseo, pero no más de este porcentaje.

Apoyando la idea de la probable conveniencia del uso de compuestos de polímero/HAp con porcentajes bajos de HAp, parece ser que el parámetro de porosidad de los materiales está ligado

directamente a esta concentración. Asefnejad y col. (2015) consideran que el tamaño, la morfología y la interconectividad de los poros, determina la capacidad de los andamios para la difusión de los nutrientes, la liberación de productos metabólicos, la adhesión celular, el crecimiento celular interno y la angiogénesis; en su estudio demostró que al incrementar el contenido de nFHAp (nano-Fluor-hidroxiapatita) a un compuesto de PU/nFHAp al 0, 5, 10 y 20%, la porosidad y el tamaño del poro disminuyeron. Boissard y col. (2009) también observaron esa disminución en la porosidad al aumentar la cantidad de nHAp en la composición de un andamio de PU, para ellos, el composito con 10% en peso de nHAp fue el más adecuado, ya que mejoró la resistencia del andamio, conservando las propiedades viscoelásticas, sin cambios significativos en la porosidad del andamio.

Para la evaluación de la adhesión y proliferación celular sobre los distintos biomateriales, la información obtenida por medio del análisis de composición elemental EDS en el MEB es también importante. En este análisis de los biomateriales, un aumento del contenido de carbono es considerado como un indicador de la presencia de materia orgánica (células) sobre la superficie de los materiales; al ser comparada la composición de cada biomaterial con células con la composición del biomaterial ausente de células (cuyo contenido en carbono fue muy similar en los tres compuestos), los resultados indican que, bajo condiciones de cultivo, el contenido de carbono aumentó 6 veces más en el biomaterial con nHAp al 5%, 8.3 veces más en aquel con nHAp al 10% y 2.5 veces más en aquel con nHAp al 20%. Aunque estadísticamente la correlación entre la composición de nHAp de los biomateriales y el contenido de carbono no resultaron significativos, los resultados del EDS por sí solos demuestran la capacidad de los biomateriales PU/nHAp para inducir la adhesión y proliferación celular sobre los biomateriales.

Respecto al análisis EDS del grado de mineralización, visualmente las micrografías muestran la deposición de nódulos de calcio sobre la superficie de los biomateriales a los 10 días de cultivo después de la adición de ácido ascórbico. En la evaluación de la relación Ca/P, que es un indicador del grado de diferenciación celular reflejado por la maduración y mineralización de la matriz osteoide sobre la superficie de los materiales, al comparar la composición de los materiales bajo condiciones de cultivo con la composición de los materiales sin células, los materiales en ausencia de células presentaron una relación de Ca/P de 1.95 y los materiales en presencia de células de 2.22 con nHAp al 5% (1.33 veces más que el material ausente de células), 2.49 con nHAp al 10% (1.5 veces más que el material ausente de células) y 2.40 con nHAp al 20% (1.45 veces más que el material ausente de células). Estas diferencias confirman la formación de una matriz mineralizada y la deposición de calcio sobre los materiales en condiciones de cultivo, que aunque estadísticamente los resultados de la correlación entre el contenido de nHAp en los biomateriales y el grado de mineralización no fueron significativos, por sí solas el aumento en la relación de Ca/P nos muestra la capacidad osteoconductiva y el estímulo a la mineralización de los biomateriales de PU/nHAp.

Respecto a la evaluación del fenotipo osteoblástico por medio de la expresión de los marcadores osteogénicos: osteocalcina (OCN), colágeno tipo I (CTI) y osterix (OTX), al día de hoy, no existe un perfil de expresión durante el proceso de osteogénesis bien definido en una línea de tiempo. No hay un consenso entre las referencias bibliográficas al respecto. A grandes rasgos se considera al colágeno tipo I como un marcador temprano del proceso osteogénico, expresado en el periodo de proliferación de los osteoblastos y en el periodo de deposición y maduración de la matriz extracelular (Angwarawong *et al.*, 2011; Kirkham y Cartmell, 2007; Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006); a la osteocalcina como un marcador tardío de la diferenciación osteoblástica, expresado en o cerca de la mineralización (Angwarawong *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Davies *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2012;

Kirkham y Cartmell, 2007); y respecto a osterix, diversos autores consideran que es un factor de transcripción crítico en la diferenciación de los osteoblastos y que actúa en la regulación de la expresión de otros genes como aquellos que codifican para la osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea y colágeno tipo I, durante el proceso de osteogénesis (Ohyama *et al.*, 2004; Nakashima, Zhou, Kunkel, Zhang, Deng, Behringer y Crombrughe, 2002; Kirkham y Cartmell, 2007), si esto fuese cierto, se podría suponer que Osterix podría expresarse al inicio del proceso de osteogénesis y que su expresión podría ser continua a lo largo del proceso.

En la evaluación del perfil de expresión de estos marcadores, en los cultivos control, en los cuales teóricamente se puede apreciar la expresión de estos marcadores sin la influencia de los biomateriales, la expresión de la osteocalcina por la medición de los productos PCR por medio de electroforesis, considerando la expresión en los días 1, 5, 7 y 14, los datos obtenidos sugieren que la expresión aumenta al paso del tiempo, lo cual es congruente con la bibliografía previa que la considera un marcador osteogénico tardío.

Respecto a la expresión del colágeno tipo I, considerando la expresión en los días 1, 5, 7 y 14 de los cultivos control, los datos obtenidos muestran que la expresión se mantiene aproximadamente constante los días 1 y 5, y posteriormente ésta disminuye paulatinamente al paso de los días; evaluada tanto por electroforesis como por TBO, los datos coinciden. Estos datos son congruentes con las referencias bibliográficas que consideran al colágeno tipo I como un marcador de la diferenciación osteoblástica.

En la evaluación de la expresión de osterix, considerando las muestras control de los días 1, 5, 7 y 14, los resultados obtenidos muestran gráficamente una expresión poco variable a lo largo de los días, ligeramente disminuida al día 14, evaluada tanto por electroforesis como por TBO, los datos

coinciden. Estos datos también son congruentes con la bibliografía existente, si se considera a osterix como un marcador que se expresa de manera continua a lo largo del proceso de osteogénesis.

En el ensayo llevado a cabo para evaluar la expresión de los genes marcadores de osteogénesis en los cultivos en contacto con los biomateriales, los cuales se encontraban en un medio no osteogénico y fueron comparados con un cultivo control en medio osteogénico, se pretendió evaluar la capacidad osteoinductiva de los biomateriales por sí solos, respecto a cultivos de células en condiciones que estimulan la osteogénesis (cultivo control) y que representaría un estímulo teórico del 100%. Respecto a la expresión de osteocalcina, al día 10, el estímulo parecería ser menor con los biomateriales comparados con el cultivo estimulado por un medio osteogénico, sin embargo, a este tiempo la correlación entre la composición de nHAp del biomaterial y la expresión génica resultaron estadísticamente no significativos. No obstante, en los cultivos al día 6 con biomateriales, se pudo ver que hubo un mayor estímulo osteoinductivo por parte de los biomateriales respecto al control, mayor aún con el compuesto PU/nHAp al 20%, dato de importancia dado que muestra la capacidad osteoinductiva y osteoconductiva de los biomateriales por sí solos, sin un estímulo osteogénico externo.

Respecto al colágeno tipo I, visualmente se puede ver que el biomaterial que aparentemente presentó mayor capacidad osteoinductiva por sí solo fue el compuesto PU/nHAp al 5%, comparado con el control, en ambos tiempos, al día 6 y 10.

Es posible observar con mayor claridad la capacidad osteoinductora de los biomateriales PU/nHAp en la evaluación de la expresión de osterix, al día 10, el estímulo de la expresión de osterix fue alrededor de 5 veces más con los compuestos al 5 y 20% de nHAp y, poco más de 6 veces con el compuesto PU/nHAp al 10%.

En este ensayo para la evaluación de la expresión génica en contacto con los distintos biomateriales, aunque estadísticamente la correlación entre el porcentaje de nHAp y expresión génica no resultó estadísticamente significativa, a excepción del día 6 en la expresión de osteocalcina, los datos gráficos permiten ver la capacidad osteoconductiva de los biomateriales por sí solos, sin la necesidad de un estímulo osteogénico externo. La repetición futura de un mayor número de ensayos podría arrojar resultados más contundentes, que probablemente mostrarían en mayor medida la bioactividad de estos compositos, capacidad demostrada por los ensayos de viabilidad, proliferación y mineralización sobre los compositos de PU/nHAp y obtener un resultado estadístico concluyente acerca de cuál composición PU/nHAp estimula en mayor grado la expresión de cada uno de estos genes.

En el estudio llevado a cabo por Brakefield y col. (2011) para la caracterización de tres grupos de células MC3T3-E1, en diferentes estadios de vida cada uno; un cultivo era de células “viejas” congeladas por más de un año y con diez divisiones celulares posteriores al momento de su evaluación; otro de células “recién descongeladas”, también con un año previo de congelamiento, y analizadas en la segunda división posterior al descongelamiento; y un cultivo de células “nuevas”, las cuales nunca habían sido congeladas y fueron analizadas en su división celular número tres. En este estudio analizaron la proliferación celular y la expresión de fosfatasa alcalina a un mismo número de tiempos en los tres tipos de cultivo, y observaron que el tiempo de vida de las células influía significativamente tanto en la proliferación celular como en la expresión de la fosfatasa alcalina; así, las células “nuevas” presentaron en mayor grado ambos parámetros a mismos tiempos y el aumento de ambos fue constante y de manera exponencial; el comportamiento de las células “recién descongeladas” fue similar, aunque con aumentos menos marcados; en cambio, las células “viejas” presentaron una proliferación celular lenta, que nunca alcanzó los niveles de los otros dos tipos, y la

expresión de la fosfatasa alcalina se mantuvo constante en todos los tiempos, sin el aumento exponencial observado en los otros cultivos. Esto puede ser un fuerte factor por el cual no existe un consenso entre los diversos trabajos publicados sobre el perfil de la expresión los distintos genes estudiados como marcadores osteogénicos. Sabiendo que el envejecimiento celular influye de manera importante en el comportamiento celular, evidenciado por la proliferación en los cultivos y la expresión génica disminuida comparada con cultivos jóvenes, este factor no influyó en nuestros resultados.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

- Ninguno de los biomateriales PU/nHAp es citotóxico y tampoco presentan efectos inhibitorios en el crecimiento celular, estos resultados fueron evidenciados por la evaluación de la viabilidad celular relativa en los ensayos de azul de alamar.
- La viabilidad celular sobre los distintos biomateriales evaluados, parece estar ligada directamente al porcentaje de nHAp en la composición de éstos, de acuerdo a los resultados estadísticos de la correlación entre estas dos variables; es decir, la viabilidad celular aumenta al aumentar el porcentaje de nHAp en la composición de los biomateriales PU/nHAp.
- Las micrografías en el MEB y el análisis de composición por EDS permitieron ver que hubo adhesión y proliferación celular sobre los compositos evaluados, aunado a la información obtenida por otros ensayos en este proyecto, ésta podría estar vinculada directamente al porcentaje de nHAp del biomaterial.
- El grado de mineralización inducido por los distintos biomateriales PU/nHAp evaluados, se relaciona directamente al porcentaje de nHAp del biomaterial; al aumentar el porcentaje de nHAp, el grado de mineralización también aumenta.
- Los datos sugieren que el composito PU/nHAp al 20% podría ser el que estimula en mayor grado la adhesión, proliferación, diferenciación celular y mineralización sobre sí mismo.
- En la evaluación de la expresión génica, de osteocalcina, osterix y colágeno tipo I, en cultivos celulares sin presencia de los biomateriales, se pudo observar un perfil de expresión a lo largo del tiempo congruente a algunas referencias de estudios previos con estos genes.

- En la evaluación de la expresión génica en cultivos en contacto con los biomateriales a evaluar, se pudo evidenciar la capacidad osteoinductiva y la bioactividad de los biomateriales PU/nHAp, sin la necesidad de un estímulo osteogénico externo. Los resultados aún no son concluyentes para saber cuál de los tres biomateriales PU/nHAp estimula en mayor grado la expresión génica.

## **10. CONCLUSIONES**

Se confirma la hipótesis de trabajo: Los biomateriales compuestos de poliuretano y nano-hidroxiapatita, con composiciones al 20% en peso de hidroxiapatita y menores, estimulan la diferenciación celular y la mineralización de tejido óseo neoformado.

## 11. Referencias bibliográficas

Angwarawong T, Dubas ST, Arksornnukit M, Pavasant P. (2011). Differentiation of MC3T3-E1 on poly(4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid) sodium salt- coated films. *Dent Mater J*, 30 (2), 158–169.

Arnsdorf EJ, Tummala P, Castillo AB, Zhang F, Jacobs CR. (2010). The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. *J Biomech*, 43(15), 2881–2886.

Asefnejad A, Behnamghader A, Taghi M, Khorasani, Farsadzadeh B. (2011). Polyurethane/fluor-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Part I: morphological, physical, and mechanical characterization. *Int J Nanomedicine*, 6, 93–100.

Bernards MT, Qin C, Ratner B, Jiang S. (2008). Adhesion of MC3T3-E1 cells to bone sialoprotein and bone osteopontin specifically bound to collagen I. *J Biomed Mater Res A*, 86 (3), 779–787.

Bohner M, Baumgart F. (2004). Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials*, 25(17), 3569–3582.

Boissard CI, Bourban PE, Tami AE, Alini M, Eglin D. (2009). Nanohydroxyapatite/poly(ester urethane) scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 5 (9), 3316–3327.

Brakefield AC, Prieto EM, Guelcher SA. (2011). A Characterization of Three Groups of MC3T3-E1 Pre-Osteoblastic Cells to Aid in Testing of Polyurethane-Bone Scaffolds for Wound Healing. *Young Scientist Journal*, 1.

Breljak D, Ambriovic-Ristov A, Kapitanovic S, Cacev T, Gabrilovac J. (2005). Comparison of three RT-PCR based methods for relative quantification of mRNA. *Food Technol. Biotechnol*, 43(4), 379-388.

Chen Y, Huang Z, Li X, Li S, Zhou Z, Zhang Y, Feng QI, Yu B. (2012). In Vitro Biocompatibility and Osteoblast Differentiation of an Injectable Chitosan/Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffold. *J Nanomater.*

Chuenjitkuntaworn B, Supaphol P, Pavasant P, Damrongsri D. (2010). Electrospun poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite composite fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Polym Int*, 59, 227–235.

Cunningham E, Dunne N, Walker G, Maggs C, Wilcox R, Buchanan F. (2010). Hydroxyapatite bone substitutes developed via replication of natural marine sponges. *J Mater Sci Mater Med*, 21(8), 2255–2261.

Davies JT, Lam J, Tomlins PE, Marshall D. (2010). An *in vitro* multi-parametric approach to measuring the effect of implant surface characteristics on cell behaviour. *Biomed Mater*, 5, 7pp.

Dong Z, Li Y, Zou Q. (2009). Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. *Appl Surf Sci*, 255(12), 6087–6091.

Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, Del Canto M, Blanco L. (2006 a). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, 47-51.

Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, Del Canto M, Blanco L. (2006 b). Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, 151-157.

Gil HB, Ginebra TD, Planell NI. (2008). Biomateriales. Elisava TdD. Recuperado el 30 de julio 2013, de [http://tdd.elisava.net/coleccion/20/gil\\_ginebra\\_planell-es](http://tdd.elisava.net/coleccion/20/gil_ginebra_planell-es)

Herráez A, Luque J. (2002). RT-PCR: amplificación de RNA. En *Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. (1ª ed.) (pp. 195-197). Madrid, España: Edit. Harcourt.

Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. (2009). In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol*, 57, 318–323.

Jarrahay R, Huang W, Rudkin GH, Lee JM, Ishida K, Berry MD, Sukkarieh M, Wu BM, Yamaguchi DT, Miller TA. (2005). Osteogenic differentiation is inhibited and angiogenic expression is enhanced in MC3T3-E1 cells cultured on three-dimensional scaffolds. *Am J Physiol Cell Physiol*. 289, 408–414.

Killen AA. (1995). A visible spectrophotometric assay for submicrogram quantities of DNA, including PCR-amplified DNA. *Microchem. J.*, 52, 333-340.

Kirkham GR, Cartmell SH. (2007). Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis. Topics in Tissue Engineering. Vol. 3. Eds. Ashammakhi N, Reis RL, Chiellini E. Edit. Expertissues. Stoke-on-Trent, Reino Unido. Capítulo 13. Pág. 1-22.

Lafita J. (2003). Fisiología y fisiopatología ósea. *An Sist Sanit Navar*, 26(3).

Laschke NW, Strohe A, Menger MD, Alini M, Eglin D. (2010). In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 6(6), 2020–2027.

Liu X, Smith LA, Hu J, Ma PX. (2009). Biomimetic Nanofibrous Gelatin/Apatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, 30 (12), 2252–2258.

Martínez AB, Carbajal G, Torres R, Téllez L, Esparza HE. (2011). Production of polyurethane/nano-hydroxyapatite hybrid materials and microstructural characterization. *Int J Phys Sci*, 6 (11), 2731-2743.

Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R. (2006). Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, 27 (17), 3230–3237.

Monjo M, Petzold C, Ramis JM, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. (2012). In vitro osteogenic properties of two dental implant surfaces. *Int J Biomater*, 2012, 14 páginas.

Munarin F, Guerreiro SG, Grellier MA, Tanzi MC, Barbosa MA, Petrini P, Granja PL. (2011). Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 12 (3), 568–577.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JD, Behringer R, Crombrughe B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, 17–29.

Ohyama Y, Nifuji A, Maeda Y, Amagasa T, Noda M. (2004). Spatiotemporal association and Bone Morphogenetic Protein regulation of sclerostin and osterix expression during embryonic osteogenesis. *Endocrinology*, 145(10), 4685–4692.

Park JW, Kim YJ, Jang JH, Song H. (2010). Osteoblast response to magnesium ion-incorporated nanoporous titanium oxide surfaces. *Clin Oral Impl Res*, 21, 1278–1287.

Piticescu RM, Buruiana T, Plesu N, Vasile E, Moldovan C, Fartat B, Rusti C.(2010). Soft chemical methods integration with micro fabrication in developing new scaffolds for tissue engineering. *Optoelectron Adv Mat*, 4(3), 401 – 406.

Popescu LM, Piticescu RM, Antonelli A, Rusti CF, Carboni E, Sfara C, Magnani M, Badilita V, Vasile E, Trusca R, Buruiana T. (2013). Recent advances in synthesis, characterization of hydroxyapatite/polyurethane composites and study of their biocompatible properties. *J Mater Sci: Mater Med*, 24, 2491–2503.

Reynaga B, Zeni SN. (2009). Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 43 (2), 177-93.

Tsai MT, Lin DJ, Huang S, Lin HT, Chang WH. (2012). Osteogenic Differentiation is Synergistically Influenced by Osteoinductive Treatment and Direct Cell–Cell Contact between Murine Osteoblasts and Mesenchymal Stem Cells. *Int Orthop*, 36(1),199-205.

Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach P, Franceschi R. (1999). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res*, 14(6), 893-903.

Xu W, Xu L, Chen M, Mao YT, Xie ZG, Wu SL, Dong QR. (2012). The effects of low dose X-irradiation on osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *BMC Musculoskelet Disord*, 13 (94).

Yazid MD, Ariffin SH, Senafi S, Razak MA, Wahab RM. (2010). Determination of the differentiation capacities of murine's primary mononucleated cells and MC3T3-E1 cells. *Cancer Cell Int*, 10 (42).

Zhang Y, Cui Y, Luan J, Zhou X, Zhang G, Han J. (2012). Platelet–derived growth factor receptor kinase inhibitor AG–1295 promotes osteoblast differentiation in MC3T3–E1 cells *via* the Erk pathway. *Biosci Trends*, 6(3), 130–135.

## 12. ANEXO

### Glosario de abreviaturas

Abs: Absorbancia

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ALP: Fosfatasa alcalina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas, por sus siglas en inglés, *bone morphogenetic proteins*

BMU: Unidades básicas multicelulares, por sus siglas en inglés, *basic multicellular units*

BSP: Sialoproteína ósea

Cbfa1: Factor de unión al núcleo alpha 1, por sus siglas en inglés *Core-binding factor alpha-1*.

CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos, por sus siglas en inglés, *granulocyte macrophage progenitor-granulocyte, monocyte*.

CS: Quitosana

CTI: Colágeno tipo I

dATP: Desoxiadenosina trifosfato

dCTP: Desoxicitidina trifosfato

dGTP: Desoxiguanosina trifosfato

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DTT: Ditioneitol (Dithiothreitol)

dTTP: Desoxitimidina trifosfato

ECM: Matriz extracelular, por sus siglas en inglés, *extracellular matrix*.

EDS: Espectrometría de dispersión de energía de rayos X

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico, por sus siglas en inglés, *fibroblast growth factor*

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GC: Guanina y citosina

HAp: Hidroxiapatita

HCl: Ácido clorhídrico

IGF: Factor de crecimiento insulínico, por sus siglas en inglés, *insulin-like growth factor*

MEB: Microscopía electrónica de barrido o Microscopio electrónico de barrido

MEM- $\alpha$ : Medio Mínimo Esencial  $\alpha$

MMP: Metaloproteasas de la matriz, por sus siglas en inglés, *matrix metalloproteinases*

nHAp: nano-hidroxiapatita

OCN: Osteocalcina

OPN: Osteopontina

OTX: Osterix

pb: Pares de bases

PBS: Buffer fosfato salino, conocido por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento y diferenciación plaquetario, por sus siglas en inglés, *platelet-derived growth factor*

PLLA: Poli (ácido L-láctico)

PM: Peso molecular

PTH: Hormona paratiroidea

PTHrP: Receptor de la hormona paratiroidea

PU: Poliuretano

RGD: Secuencia arginina-glicina-aspártico, por sus siglas en inglés, *arginine-glycine-aspartic acid*

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

TBO: tinción con azul de toluidina

TCPS: Platos de cultivo de poliestireno, por sus siglas en inglés, *tissue-culture polystyrene plate*

TGF $\beta$ : Factor de crecimiento tumoral beta, por sus siglas en inglés, *transforming growth factor beta*

Tm: Temperatura de alineamiento

TRAP: Fosfatasa ácida tartrato resistente, por sus siglas en inglés, *Tartrate-resistant acid phosphatase*

URO: Unidad de remodelamiento óseo

UV: ultravioleta