



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Desarrollo de matrices a base de
alginatos con aplicación en Ingeniería
de Tejido Óseo y Cartilaginoso***

Tesista: *Lic. María Luz Torres*

Director: *Dr. Juan Manuel Fernández*

Co-directora: *Dra. Tamara Gisela Oberti*

Año: 2020

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido desarrollado para acceder al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Fernández y la co-dirección de la Dra. Tamara Gisela Oberti. El mismo se realizó en el Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM, CIC-UNLP) y el Grupo Macromoléculas del Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA, CONICET-UNLP) ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Buenos Aires, Argentina.

Su realización ha sido posible gracias a la beca doctoral otorgada el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).



RESUMEN

Ingeniería de tejido ha sido definida como una ciencia interdisciplinaria cuyo fin es la síntesis de materiales que logren mejorar o a restaurar el tejido dañado con el fin de establecer terapias alternativas para tratamientos en caso de pérdida de tejido o fallas de órganos esenciales, ya que los trasplantes están frecuentemente limitados por la escasez de donantes y el alto riesgo de rechazo o transferencia de enfermedades. Por este motivo, el presente trabajo de tesis tiene como objetivo el desarrollo de hidrogeles basados en alginato de sodio que permitan la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso.

En una primera etapa de este trabajo, se extrajo alginato de sodio de la nervadura y lámina del alga parda *Undaria pinnatifida*. Junto con el polisacárido de origen comercial, los aislamientos fueron caracterizados fisicoquímicamente. Además, con el objetivo de minimizar su posible potencial inmunogénico, se utilizó un método de purificación simple que permitió disminuir impurezas tales como proteínas y polifenoles. Para evaluar el éxito de este proceso, se analizó la producción de un marcador de citotoxicidad y la morfología de un modelo de macrófagos en cultivo (RAW 264.7) en presencia de los distintos alginatos, observándose que el efecto tóxico inicial de las muestras crudas resultó prevenido sin producir cambios relevantes en las características fisicoquímicas del polímero. Además, al estudiar la capacidad osteogénica del polisacárido, se encontró que la proliferación y diferenciación de CPMO se vio favorecida con la purificación del mismo.

Por otra parte, se procedió a la síntesis de hidrogeles de alginato entrecruzados iónicamente con estroncio con el fin de obtener materiales con actividad osteogénica y capacidad de liberación droga de manera localizada en el sitio de interés. Se lograron matrices de gran hinchamiento, pero con un porcentaje de degradabilidad muy alto, alcanzado luego de sólo 24 h, motivo por el cual se planteó un nuevo diseño para la fabricación de *scaffolds* a base de alginato.

Posteriormente, se desarrollaron biomateriales a partir de la síntesis de redes poliméricas de HEMA-EGDMA semi-interpenetradas (SIPN) con alginato. Con este método se obtuvieron cuatro hidrogeles en los que se variaron las proporciones de iniciador y entrecruzante para obtener una familia de SIPN con propiedades versátiles (HA, HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.5), además de una matriz sin alginato (pHEMA) con el fin de evaluar el efecto producido por la incorporación del polisacárido al material. Estos fueron observados por SEM y se le realizaron pruebas de hinchamiento, degradación, pruebas mecánicas y medidas de ángulo de contacto. Se encontraron materiales con porosidad baja, pero con mejoras en la capacidad de hinchamiento y degradabilidad debida a la incorporación de alginato a la matriz polimérica. Además,

se encontró que HA y HA-E0.25 presentaron propiedades mecánicas en el orden del tejido cartilaginoso.

Por su parte, los estudios *in vitro* mostraron que los materiales con alginato exhibieron una muy buena biocompatibilidad. También se demostró la versatilidad de estos hidrogeles, ya que permitieron la adhesión y proliferación de tres tipos celulares distintos. Además, el agregado de alginato favoreció el desarrollo osteogénico de las células progenitoras de médula ósea (CPMO) y el crecimiento de condrocitos primarios, estabilizando el fenotipo condrogénico en el tiempo tanto con respecto a pHEMA como a las células crecidas en monocapa sobre el plato de cultivo estándar. Por su parte, también se evaluó la respuesta inmunogénica con RAW 264.7, encontrando que la incorporación del polisacárido a una red polimérica de HEMA-EGDMA previene un posible efecto citotóxico de pHEMA.

Por último, se empleó un modelo *in vivo* para evaluar tres (pHEMA, HA y HA-E0.25) de nuestros biomateriales como sustitutos óseos. Se seleccionó un modelo de lesión en calota en roedores ampliamente utilizado por otros investigadores. En el defecto creado, se implantaron los hidrogeles con previa hidratación en PBS durante dos días. En la evaluación histológica realizada sobre los cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina no se evidenció rechazo del material, observándose la formación de tejido conjuntivo denso y frentes de reosificación en HA y HA-E0.25. Sin embargo, no se apreció la penetración celular hacia el material, lo que indica que es necesario rediseñar la arquitectura de los *scaffolds* para aumentar su porosidad.

En conjunto, estos resultados resultan muy prometedores en cuanto a la potencialidad de HA, HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-E0.5 para ser utilizados como sustitutos biológicos en regeneración ósea y/o cartilaginosa.

INDICE DE CONTENIDO

I INTRODUCCIÓN GENERAL

- 08 I.1 Tejido óseo
 - 08 I.1.1 Composición del tejido óseo
 - 08 I.1.1.1 Matriz extracelular
 - 10 I.1.1.2 Células del tejido óseo
 - 13 I.1.2 Estructura del hueso
 - 16 I.1.3 Osteogénesis
 - 18 I.1.4 Reparación ósea
 - 20 I.1.5 Lesiones del tejido óseo y tratamiento
- 22 I.2 Tejido cartilaginoso
 - 23 I.2.1 Composición del cartílago articular
 - 25 I.2.2 Estructura del cartílago articular
 - 27 I.2.3 Condrogénesis
 - 28 I.2.4 Lesiones del cartílago articular y tratamiento
 - 30 I.2.4.1 Microfractura
 - 30 I.2.4.2 Implantes
 - 32 I.2.4.3 Trasplantes
- 34 I.3 Ingeniería de tejidos
 - 35 I.3.1 Células
 - 36 I.3.2 Factores de crecimiento
 - 37 I.3.2.1 Ranelato de estroncio (RaSr)
 - 38 I.3.2.2 *Scaffolds*
 - 39 I.3.2.3 Alginato
 - 40 I.3.2.4 Hidrogeles semi-interpenetrados

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- 44 II.1 Hipótesis
- 45 II.2 Objetivos
 - 45 II.2.1 Objetivo general
 - 45 II.2.2 Objetivos específicos

III EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATO DE SODIO

- 47 III.1 Introducción
 - 47 I.1.1 Alginato
- 51 III.2 Materiales y métodos
 - 51 III.2.1 Reactivos y drogas
 - 51 III.2.2 Fuente de alginato
 - 52 III.2.3 Extracción de alginato
 - 54 III.2.4 Purificación de alginato
 - 55 III.2.5 Técnicas de caracterización
 - 55 III.2.5.1 Espectroscopía FTIR
 - 56 III.2.5.2 Espectroscopía 1H-RMN
 - 56 III.2.5.3 Análisis termogravimétrico
 - 56 III.2.5.4 Viscosidad

III EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATO DE SODIO

- 57 III.2.5.5 Determinación de polifenoles
- 57 III.2.5.6 Evaluación de proteínas
- 58 III.2.6 Estudios de biocompatibilidad
 - 58 III.2.6.1 Cultivos celulares
 - 58 III.2.6.1.1 Células progenitoras de médula ósea (CPMO)
 - 59 III.2.6.1.2 Células RAW 264.7 (ATCC TIB-71)
 - 59 III.2.6.2 Incubaciones
 - 59 III.2.6.3 Viabilidad celular
 - 60 III.2.6.4 Evaluación de la capacidad osteogénica
 - 61 III.2.6.4.1 Actividad de fosfatasa alcalina (FAL)
 - 61 III.2.6.4.2 Producción de colágeno tipo 1
 - 62 III.2.6.5 Evaluación de citotoxicidad
 - 62 III.2.6.5.1 Producción de NO
- 63 III.2.7 Análisis estadístico
- 64 III.3 Resultados y discusión
 - 64 III.3.1 Extracción de alginato de sodio
 - 65 III.3.2 Purificación de alginato de sodio
 - 66 III.3.3 Caracterización de alginato de sodio
 - 66 III.3.3.1 Espectroscopía FTIR
 - 67 III.3.3.2 Espectroscopía 1H-RMN
 - 69 III.3.3.3 Análisis termogravimétrico
 - 71 III.3.3.4 Viscosidad
 - 74 III.3.3.5 Determinación de polifenoles
 - 75 III.3.3.6 Evaluación de proteínas
 - 76 III.3.4 Estudios de biocompatibilidad
 - 77 III.3.4.1 Viabilidad celular
 - 78 III.3.4.2 Evaluación de la capacidad osteogénica
 - 81 III.3.4.3 Evaluación de citotoxicidad
- 85 III.4 Conclusiones parciales

INDICE DE CONTENIDO

IV

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN DE Sr⁺² A PARTIR DE ENTRECruzAMIENTO IÓNICO CON ALGINATO DE SODIO

- 87 IV.1 Introducción
- 88 IV.1.1 Ranelato de estroncio (RaSr)
- 90 IV.1.2 Sistemas de liberación de droga
 - 91 IV.1.2.1 Liberación controlada por difusión
 - 91 IV.1.2.2 Liberación controlada por erosión o biodegradación
 - 91 IV.1.2.3 Liberación controlada por hinchamiento
- 92 IV.2 Materiales y métodos
 - 92 IV.2.1 Reactivos y drogas
 - 92 IV.2.2 Obtención de hidrogeles
 - 93 IV.2.3 Liberación de Sr⁺²
 - 94 IV.2.4 Estudio de hinchamiento y degradación
 - 95 IV.2.5 Análisis estadístico
- 96 IV.3 Resultados y discusión
 - 96 IV.3.1 Obtención de hidrogeles
 - 97 IV.3.2 Liberación de Sr⁺²
 - 101 IV.3.3 Estudio de hinchamiento y degradación
- 108 IV.4 Conclusiones parciales

V

DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES DE HIDROGELES SEMI-INTERPENETRADOS (sIPN) CON ALGINATO DE SODIO

- 110 V.1 Introducción
 - 112 V.1.1 Estudios *in vivo*
- 115 V.2 Materiales y métodos
 - 115 V.2.1 Reactivos y drogas
 - 115 V.2.2 Obtención de los *scaffolds*
 - 117 V.2.3 Estudio de los *scaffolds*
 - 117 V.2.3.1 Topografía y porosidad
 - 117 V.2.3.2 Estudio de hinchamiento
 - 118 V.2.3.3 Estudios de degradación
 - 118 V.2.3.3.1 Degradación acelular
 - 118 V.2.3.3.2 Degradación celular
 - 118 V.2.3.4 Medidas de ángulo de contacto
 - 119 V.2.3.5 Pruebas mecánicas
 - 119 V.2.4 Estudios de biocompatibilidad
 - 120 V.2.4.1 Cultivos celulares
 - 120 V.2.4.1.1 Condrocitos
 - 121 V.2.4.2 Viabilidad celular
 - 121 V.2.4.3 Evaluación de la capacidad osteogénica
 - 122 V.2.4.3.1 Expresión de marcadores moleculares osteogénicos

V

- 123 V.2.4.4 Evaluación de la capacidad condrogénica
 - 123 V.2.4.4.1 Expresión de marcadores moleculares condrogénicos
- 124 V.2.4.5 Evaluación de citotoxicidad
- 124 V.2.5 Estudios de caracterización *in vivo*: modelo de lesión ósea
 - 124 V.2.5.1 Animales
 - 125 V.2.5.2 Modelo de regeneración ósea
 - 126 V.2.5.3 Estudio histomorfométrico
 - 126 V.2.5.3.1 Obtención de cortes histológicos
 - 126 V.2.5.3.2 Coloración histológica
 - 127 V.2.5.3.2.1 Hematoxilina y Eosina (H & E)
 - 127 V.2.5.3.2.2 Picrosirius Red
 - 127 V.2.5.3.3 Histomorfometría ósea
 - 128 V.2.6 Análisis estadístico
- 129 V.3 Resultados y discusión
 - 130 V.3.1 Estudio de los *scaffolds*
 - 130 V.3.1.1 Morfología y porosidad
 - 132 V.3.1.2 Estudio de hinchamiento
 - 138 V.3.1.3 Estudios de degradación
 - 140 V.3.1.4 Medidas de ángulo de contacto
 - 141 V.3.1.5 Pruebas mecánicas
 - 143 V.3.2 Estudios de biocompatibilidad
 - 143 V.3.2.1 Viabilidad celular
 - 145 V.3.2.2 Evaluación de la capacidad osteogénica
 - 149 V.3.2.2 Evaluación de la capacidad condrogénica
 - 152 V.3.2.3 evaluación de citotoxicidad
 - 154 V.3.3 Estudios de caracterización *in vivo*: modelo de lesión ósea
- 167 V.4 Conclusiones parciales

VI

CONCLUSIONES GENERALES

- 169 VI. Conclusiones generales

VII

REFERENCIAS

- 172 VII. Referencias

ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS

- 191 Esquemas
- 192 Figuras
- 194 Imágenes
- 196 Tablas
- 197 Abreviaturas

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Tejido óseo

El tejido óseo es el principal constituyente de los huesos. Se trata de un tejido conjuntivo especializado, denso y dinámico, que se encuentra bajo constantes procesos de modelado y remodelado. El mismo brinda apoyo estructural a todo el cuerpo, dándole sostén, ya que cada hueso o cada grupo de huesos proporcionan un armazón sobre el que fijar los tejidos blandos y los órganos. Además, el esqueleto también ejerce funciones protectoras sobre órganos vitales como el cerebro, la médula ósea hematopoyética, órganos de la cavidad torácica y pélvica. A su vez, muchos huesos actúan como palancas, ya que pueden modificar la magnitud y dirección de las fuerzas generadas por los músculos estriados. Desde un punto de vista metabólico, el tejido óseo favorece la homeostasis mineral al almacenar minerales, especialmente calcio y fósforo, que contribuyen a la regulación de la matriz extracelular [Martini et al., 2009; Tortora & Derrickson, 2013]. Además, también funciona como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento, proporcionando el microambiente necesario para la hematopoyesis en los espacios donde se aloja la médula ósea roja [Clarke, 2008].

I.1.1 Composición del tejido óseo

A nivel microscópico, el tejido óseo está compuesto por diversas células y por matriz extracelular (MEC).

I.1.1.1 Matriz extracelular

La matriz extracelular posee una fase orgánica y otra inorgánica. La primera es la encargada de la flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tracción del tejido óseo, representa entre un 20 a 40% del peso seco del hueso y está compuesta principalmente de fibras de colágeno tipo I. Por otro lado, en el hueso, casi las dos terceras partes de su peso corresponden al fosfato cálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (matriz inorgánica). Esta molécula interactúa con el hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ para formar cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Al producirse, los cristales también agregan otras sales de calcio como el carbonato cálcico, además de iones del tipo de sodio, magnesio, potasio y citrato.

Estos componentes inorgánicos proveen al hueso rigidez y resistencia a la compresión [Martini et al., 2009].

La matriz orgánica es sintetizada por células óseas y, además de las fibras de colágeno, posee proteínas no colágenas que componen lo que se denomina *sustancia fundamental* del tejido óseo. El colágeno forma hélices triples que se ensamblan para formar fibrillas, entre las cuales se crean compartimentos en donde posteriormente se depositarán los cristales minerales óseos (Imagen I.1). Además de colágeno tipo I, se encuentran pequeñas cantidades de colágeno tipo V y trazas de colágeno III, XI y XIII. Las proteínas no colágenas son esenciales para el desarrollo, crecimiento, remodelado y la reparación ósea. Entre estas se observan macromoléculas de proteoglicanos; proteínas glicosiladas, como la fosfatasa alcalina (FAL) y la osteonectina; glucoproteínas multiadhesivas, que intervienen en la adhesión de células óseas y las fibras colágenas a la sustancia fundamental mineralizada; y proteínas dependientes de vitamina K osteoespecífica, como la osteocalcina. También se puede encontrar factores de crecimiento y citoquinas, que son pequeñas proteínas reguladoras, como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), proteínas morfogénicas óseas (BMP), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) [Ross & Pawlina, 2017].

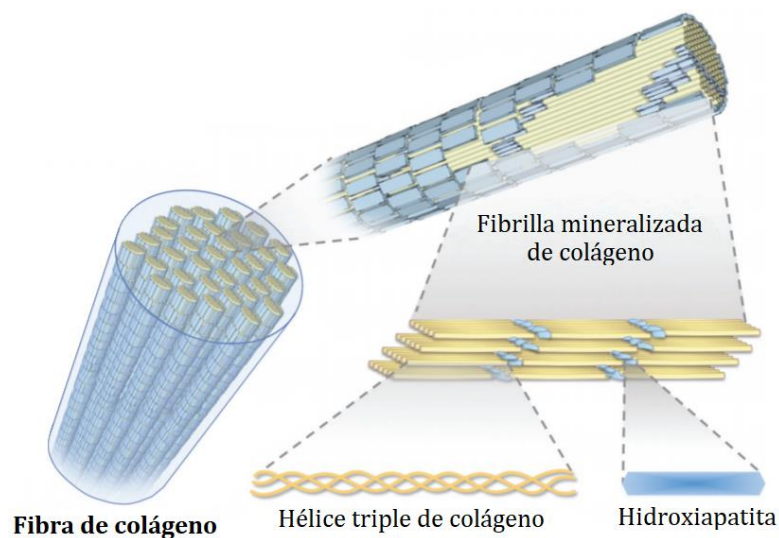


Imagen I.1. Organización microscópica de fibras de colágeno. Adaptado de He & Andersson [He & Andersson, 2017].

La mineralización es el proceso por el cual se produce la deposición de minerales en la matriz extracelular orgánica del tejido óseo. Ese proceso tiene lugar en pequeñas vesículas extracelulares que poseen muchas enzimas, tal como FAL, que incorporan Ca^{+2} y PO_4^{-3} y es iniciado por células productoras de hueso llamadas osteoblastos. Originalmente se pensaba que la mineralización se producía sólo cuando había suficientes sales para formar cristales, sin embargo, actualmente se conoce que dicho proceso requiere además la presencia de fibras colágenas. Las sales minerales comienzan a cristalizar en las vesículas extracelulares presentes entre las fibras colágenas y, luego de llenar los espacios, rompen la membrana para salir de las mismas, y allí crecen sobre las fibras con rapidez por acreción hasta que se unen con los cristales vecinos producidos de otras vesículas matriciales. Estos fosfatos de calcio se observan al microscopio dispuestos en estructuras esféricas denominadas “nódulos mineralizados” [Ross & Pawlina 2017, Geneser, 2006].

1.1.1.2 Células del tejido óseo

El metabolismo del tejido óseo involucra los siguientes tipos celulares: células progenitoras de médula ósea (CPMO), células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo y osteoclastos.

Las células progenitoras de médula ósea, también conocidas como células estromales mesenquimáticas (MSCs, del inglés *mesenchymal stem cells*), son un grupo de células indiferenciadas con un alto potencial proliferativo y capacidad de autorrenovación. Las mismas presentan pluripotencialidad, es decir, que pueden diferenciarse a distintos tipos celulares para generar tejido cartilaginoso, óseo, adiposo y muscular; y su compromiso hacia un tipo celular u otro depende de la acción de diferentes factores de transcripción, así como también de señales extra e intracelulares [Spencer et al., 2011]. Morfológicamente se caracterizan por ser células pequeñas, largas y estrechas con un núcleo redondo y de gran tamaño y nucleolo prominente. Por otro lado, las células osteoprogenitoras derivan de la diferenciación de CPMO y, durante la formación del hueso, se dividen y desarrollan para formar osteoblastos. Las mismas se asemejan a los fibroblastos dado que poseen núcleos ovales y citoplasma claro con

límites irregulares, y son fundamentales en la edad adulta ya que están relacionadas a la cicatrización de fracturas, el modelado y remodelado óseo.

Los osteoblastos o células formadoras de hueso sintetizan y secretan matriz ósea orgánica (Imagen I.2). Los mismos son responsables de la calcificación de la matriz ósea y poseen vesículas que contienen grandes cantidades de la enzima fosfatasa alcalina (FAL), que se secretan activamente durante el período en que la célula produce matriz ósea, motivo por el cual su actividad es considerada uno de los primeros marcadores del fenotipo osteoblástico. Los osteoblastos también están implicados en la activación de los osteoclastos, las células encargadas de la resorción ósea. Además, una vez finalizado el proceso de formación ósea, estas células pueden sufrir diversos destinos ya que pueden incorporarse en su propio osteoide y continuar la diferenciación hacia osteocito, transformarse en células de revestimiento o bien continuar hacia el proceso de apoptosis [Clarke, 2008]. Este tipo celular posee forma cuboide o poliédrica con un citoplasma muy basófilo que incluye un gran retículo endoplasmático y un aparato de Golgi prominente [Capulli et al., 2014; Florencio-Silva et al., 2015]. El compromiso de las CPMO hacia el linaje osteoprogenitor requiere la expresión de genes específicos, tales como Runx-2 (del inglés, *Runt-related transcription factors 2*), Dlx5 (*Distal-less homeobox 5*) y Osx (*Osterix*). Runx-2 es un gen fundamental para la diferenciación hacia osteoblastos, ya que regula la expresión de colágeno tipo I, FAL y osteocalcina (OCN), entre otros [Fakhry et al., 2013].

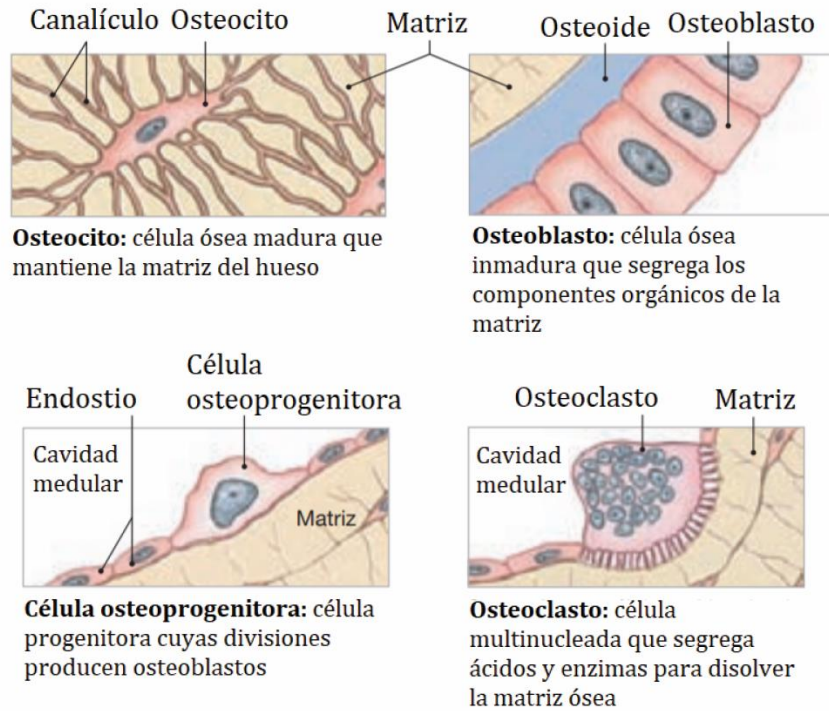


Imagen I.2. Células del tejido óseo. Adaptado de Martini [Martini et al., 2009]

Los osteocitos residen dentro de la matriz ósea mineralizada, derivan del linaje mesenquimal/osteoblástico y constituyen más del 95% de las células en la matriz ósea. Entre un 10-20% de los osteoblastos que quedan alojados en el seno del hueso se diferencian en osteocitos [Duplomb et al., 2007]. Los mismos se alojan en lagunas osteocíticas y poseen una morfología algo más alargada que los osteoblastos, con un núcleo más grande y un retículo endoplasmático menos desarrollado. Su citoplasma continúa siendo basófilo y poseen prolongaciones que se introducen en los canalículos del hueso. A través de sus proyecciones citoplasmáticas, los osteocitos establecen comunicaciones intercelulares con osteocitos vecinos mediante canales de interconexión célula-célula, por lo que son capaces de censar cambios mecánicos y traducirlos en señales químicas que actúan sobre el hueso. De esta forma, la red de osteocitos puede direccionar la remodelación ósea y reparar microfracturas [Florencio-Silva et al., 2015]. Las células de revestimiento óseo se encuentran en sitios donde no se produce un proceso metabólico activo (modelado o remodelado) del tejido óseo, poseen morfología aplanada con poco citoplasma y escasos orgánulos, y se cree que intervienen en el mantenimiento y soporte nutricional de los osteocitos [Ross & Pawlina, 2017]. También, estas células funcionan como una barrera entre la sangre y el hueso,

pero con la capacidad de rediferenciarse a osteoblastos mediante estímulos mecánicos u hormonales.

Por otro lado, los osteoclastos son células multinucleares con un gran número de mitocondrias y lisosomas. A diferencia de los tipos celulares mencionados anteriormente, estos no derivan de las CPMO, sino que provienen del linaje de precursores monocíticos. Este tipo celular se encuentra especializado en la resorción ósea, que se consigue mediante la secreción de enzimas lisosomales y líquido extracelular por parte del osteoclasto, que logra degradar la matriz orgánica y disolver el mineral óseo.

1.1.2 Estructura del hueso

En general, el hueso está compuesto por tejido óseo y otros tejidos conjuntivos como el tejido hematopoyético, el tejido adiposo, los vasos sanguíneos y los nervios. Este, excepto en las regiones donde se articula con otro hueso, se encuentra revestido por periostio, que es una cápsula de tejido conjuntivo fibroso. El mismo consta de una capa fibrosa externa de tejido conectivo denso e irregular y de una capa osteogénica interna compuesta por diversas células. El periostio también protege el hueso, participa en la consolidación de fracturas, en la nutrición ósea y sirve como punto de inserción de ligamentos y tendones. [Ross & Pawlina, 2017; Tortora & Derrickson, 2013].

El hueso no es completamente sólido, contiene pequeños espacios entre las células y los componentes de la matriz. Algunos espacios constituyen conductos para los vasos sanguíneos que brindan nutrientes a las células óseas. Otros espacios sirven como sitios de almacenamiento de la médula ósea roja. Según el tamaño y la distribución de los espacios, las regiones de un hueso pueden clasificarse como esponjosas o trabecular, constituyendo cerca del 20% del total del esqueleto; o compacto o cortical, que corresponde al 80% restante. Los diferentes huesos, e incluso regiones dentro de uno, pueden presentar una gran variabilidad en la relación del hueso cortical y trabecular. El tejido óseo compacto es denso y sólido, rodea el conducto medular y posee baja porosidad. Por otro lado, el hueso trabecular tiene una estructura esponjosa formada por trabéculas que se entrecruzan en distintas direcciones, formando un reticulado,

entre los cuales queda contenida la médula ósea [Clarke, 2008]. Existe, además, un tejido de revestimiento que cubre tanto el hueso compacto que limita con la cavidad medular como las trabéculas del hueso esponjoso y se conoce como endostio. El endostio se encuentra formado por una capa de células osteoprogenitoras que pueden diferenciarse en osteoblastos y en células de revestimiento óseo [Ross & Pawlina, 2017]. Además, el endostio también tapiza los conductos que se encuentran en el interior del tejido (conductos de Havers y de Volkmann) [Geneser, 2006].

Microscópicamente, el hueso cortical está formado por una serie de unidades cilíndricas con sus ejes mayores orientados paralelo al eje del hueso, denominadas osteonas corticales o sistemas de Havers (Imagen I.3). Cada una de ellas posee un conducto central, el conducto de Havers, que contiene los vasos sanguíneos que se encargan de su irrigación. Alrededor del mismo se disponen laminillas concéntricas compuestas de matriz ósea. Los conductos de Havers se comunican entre sí a través de conductos de Volkmann por los que también circulan vasos sanguíneos y nervios, y se reconocen por ser perpendiculares a las osteonas y por no estar rodeados de laminillas concéntricas. A su vez, en las laminillas existen espacios denominados lagunas, que alojan osteocitos con numerosas prolongaciones que se ubican en pequeños conductos de la matriz, llamados canalículos. Los canalículos de una laguna se comunican con los de las lagunas vecinas, y con conductos de Havers o Volkman, permitiendo el intercambio de sustancias entre los osteocitos y los vasos sanguíneos. Entre las osteonas se encuentran zonas de tejido óseo irregular, denominadas laminillas intersticiales, que corresponden a restos de laminillas concéntricas degradadas. Por fuera de la osteona, y siguiendo la circunferencias externas e internas de la zona central de los huesos largo, se encuentran también laminillas denominadas circunferenciales (Imagen I.3).

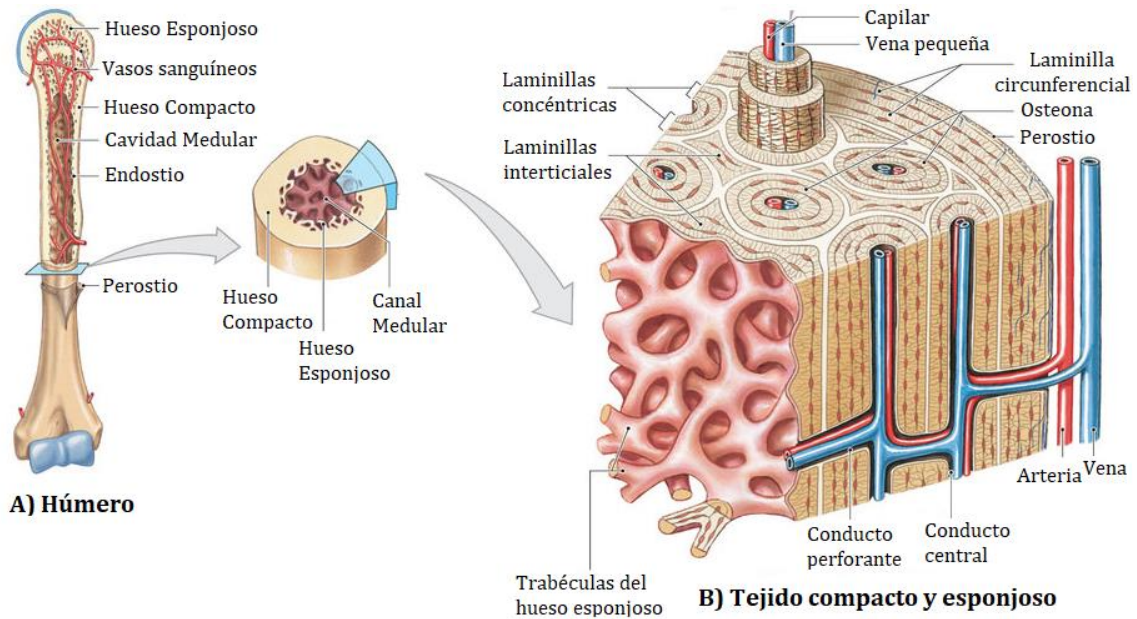


Imagen I.3. Estructura del tejido óseo. A) Anatomía macroscópica del húmero B) Vista esquemática sobre la organización histológica del hueso compacto y esponjoso. Adaptado de Martini [Martini et al., 2009]

A su vez, el tejido óseo trabecular siempre se encuentra en el interior del hueso, recubierto por tejido óseo compacto. La unidad estructural es la osteona trabecular, que tiene forma de disco plano y está formada por una serie de laminillas que transcurren paralelas a la superficie del disco (Imagen I.4). La nutrición de los osteocitos se produce por difusión a partir de la superficie cubierta por endostio mediante un sistema de canalículos comunicantes [Ross & Pawlina, 2013; Martini et al., 2009].

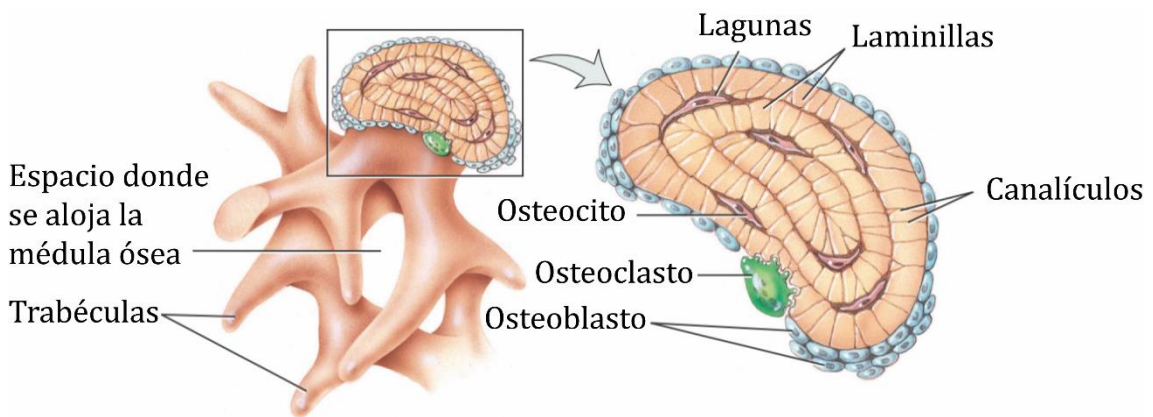


Imagen I.4 Estructura histológica del hueso trabecular o esponjoso. Adaptado de Tortora [Tortora & Derrickson, 2013]

1.1.3 Osteogénesis

La osificación es el proceso por el cual se produce la formación de tejido óseo y tiene lugar cada vez que los osteoblastos sintetizan y secretan matriz ósea orgánica que poco después se mineraliza. El desarrollo del hueso se clasifica en osificación endocondral y osificación intramembranosa, y la diferencia entre estos procesos radica en si un modelo de cartílago funciona como precursor óseo o si el hueso está formado por un método más sencillo, sin la intervención de un cartílago precursor.

La osificación intramembranosa empieza aproximadamente durante la octava semana del desarrollo embrionario y comienza con la diferenciación en osteoblastos de células madre mesenquimales (MSCs) dentro del tejido conjuntivo fibroso o embrionario. Los huesos que se originan a partir de este proceso son los que forman la bóveda del cráneo, como los huesos frontal y parietal; la mandíbula (maxilar inferior) y la clavícula [Martini et al., 2009]. Por otro lado, la osificación endocondral da lugar a la mayoría de los huesos del cuerpo (huesos cortos y largos, columna vertebral y huesos de la base del cráneo) [Teixeira et al., 2008] y ocurre alrededor de la sexta semana de gestación. En este proceso se produce cartílago hialino a partir de la diferenciación de las células mesenquimales en condrocitos, formando así un molde cartilaginoso del futuro hueso [Geneser, 2006].

La osteogénesis, es el proceso de formación de tejido óseo nuevo y ocurre durante toda la vida. Para que esto suceda, se requiere una población de células capaces de responder a estímulos moleculares que direccionen la diferenciación a células formadoras de hueso (osteoblastos), el principal regulador de este proceso es el factor denominado Runx-2 [Dalle Carbonare et al., 2012]. En situaciones normales, además del desarrollo de tejido óseo durante la embriogénesis, el hueso sufre crecimiento radial y longitudinal, modelado y remodelado mediante osteogénesis.

El modelado es el proceso por el cual el hueso cambia su forma en respuesta a influencias mecánicas o fisiológicas, provocando un ajuste gradual del esqueleto a las fuerzas ejercidas a lo largo de su vida y se lleva a cabo con mayor frecuencia durante el período de crecimiento. Para ello se produce la resorción del hueso en regiones

anatómicamente distintas, en donde el mismo puede ensancharse o cambiar su eje por remoción o adición por la acción independiente de osteoblastos y osteoclastos en respuesta a fuerzas biomecánicas [Kobayashi et al., 2003].

El remodelado, por otro lado, es un proceso que tiene como principal objetivo mantener la fortaleza ósea y la homeostasis mineral (Imagen 1.5). Ocurre desde el nacimiento hasta la muerte y, por lo tanto, coexiste con el modelado en la etapa de crecimiento. Este involucra la remoción continua de hueso viejo (el cual acumula imperfecciones y microfracturas), que luego será reemplazado por matriz ósea orgánica nueva con su subsecuente mineralización para la formación de tejido óseo. Este proceso se lleva a cabo con la acción coordinada de osteoclastos y osteoblastos que llevan, secuencialmente, a la resorción para la posterior formación de hueso nuevo [Clarke, 2008]. Cuando los osteoclastos resorben matriz ósea, movilizan el calcio del esqueleto y dejan atrás excavaciones poco profundas, que luego los osteoblastos rellenan con osteoide que incorpora calcio extracelular a medida que se mineraliza. La diferenciación hacia el fenotipo osteoclasto está dada por distintos factores secretados por los osteoblastos, tanto como el factor estimulante de colonias monocito-macrofágicas (M-CSF) y el ligando el receptor activador del factor nuclear kappa-beta (RANKL). M-CSF se une a su receptor (cFMS), presente en precursores de los osteoclastos, lo cual estimula la proliferación e inhibe su apoptosis. RANKL es un factor crucial en la osteoclastogénesis, ya que cuando se une a su receptor RANK (ubicado en la membrana citoplasmática de los pre-osteoclastos), se induce la formación de osteoclastos. A su vez, existe otro factor denominado osteoprotegerina (OPG), secretado por osteoblastos, que se une a RANKL previniendo la interacción RANK/RANKL y, consecuentemente, inhibiendo la osteoclastogénesis y la resorción ósea. El desbalance entre la formación y resorción ósea resulta en el desarrollo de varias enfermedades. Por ejemplo, la resorción excesiva de osteoclastos sin la correspondiente formación de tejido óseo nuevo por los osteoblastos contribuye a la pérdida de hueso y al desarrollo de osteoporosis [Khosla et al., 2012], mientras que el efecto contrario puede producir osteopetrosis [Sobacchi et al., 2013].

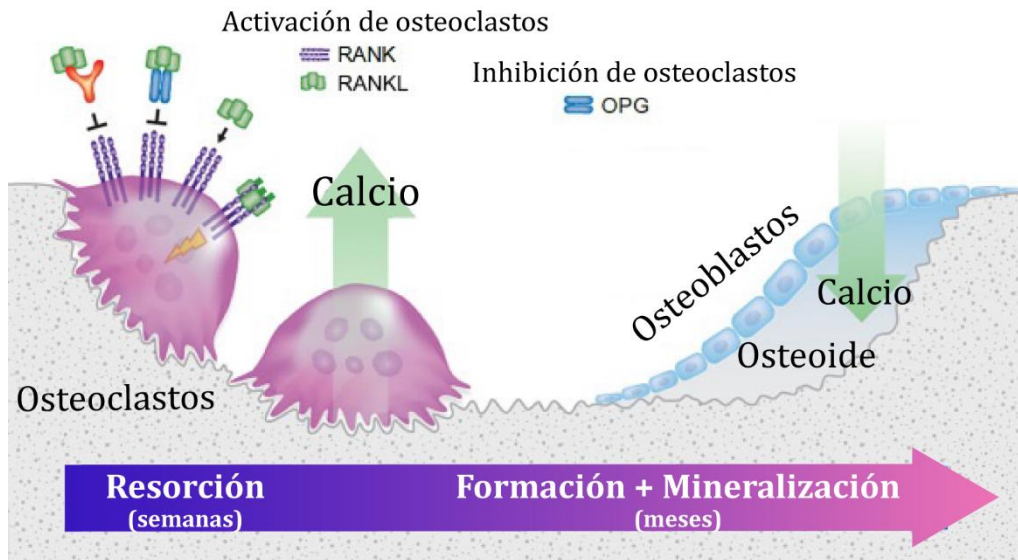


Imagen I.5. Remodelado de superficie ósea. Adaptado de Kosteniuk [Kosteniuk, 2013].

1.1.4 Reparación ósea

Desde el momento que se produce el daño, el tejido óseo es el único capaz de repararse a sí mismo sin dejar cicatrices [Liu et al., 2010]. Aunque difiere en algunos aspectos, como la inflamación y el aumento de fuerzas mecánicas en los adultos, el restablecimiento del hueso como consecuencia de una lesión o fractura se asemeja mucho al proceso de osteogénesis normal del esqueleto [Hutchison et al., 2007]. La reparación de los daños se puede dividir en etapas secuenciales que involucran varios tipos celulares y factores de crecimiento (Imagen I.6). Al producirse una fractura, se altera la integridad de los tejidos blandos, lo que produce un hematoma que provoca una respuesta inflamatoria y una subsecuente cascada pro-inflamatoria con la participación de distintos tipos de citoquinas, como IL-1, IL-6 y TNF- α , de manera temporal y especialmente regulada durante la primera semana después del daño [Mountziaris & Mikos, 2008]. Luego células osteoprogenitoras cercanas al sitio de la lesión, expresan y liberan proteínas morfogénicas óseas (BMP), que junto con la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias, reclutan más células mesenquimales. Si la fractura es mecánicamente estable, las células osteoprogenitoras se diferencian a osteoblastos para regenerar el hueso, pero si la fractura es inestable se diferencia a condrocitos para formar una capa de colágeno que actúa como puente entre los extremos de la fractura, constituyéndose así lo que se conoce como callo blando; luego

es calcificado para formar un callo óseo con una estructura desordenada, llamado plexiforme. Posteriormente se remodela para formar el hueso maduro y ordenado, llamado hueso laminar [Deschaseaux et al., 2009; Liu et al., 2010]. En este proceso de reparación participan coordinadamente diferentes tipos celulares (células osteoprogenitoras, fibroblastos, macrófagos, condroblastos, osteoblastos, osteoclastos) así como vías moleculares de señalización involucradas (proteínas inflamatorias, factores de crecimiento (TGF- β e IGF), BMP, y factores angiogénicos, entre otros) [Deschaseaux et al., 2009].

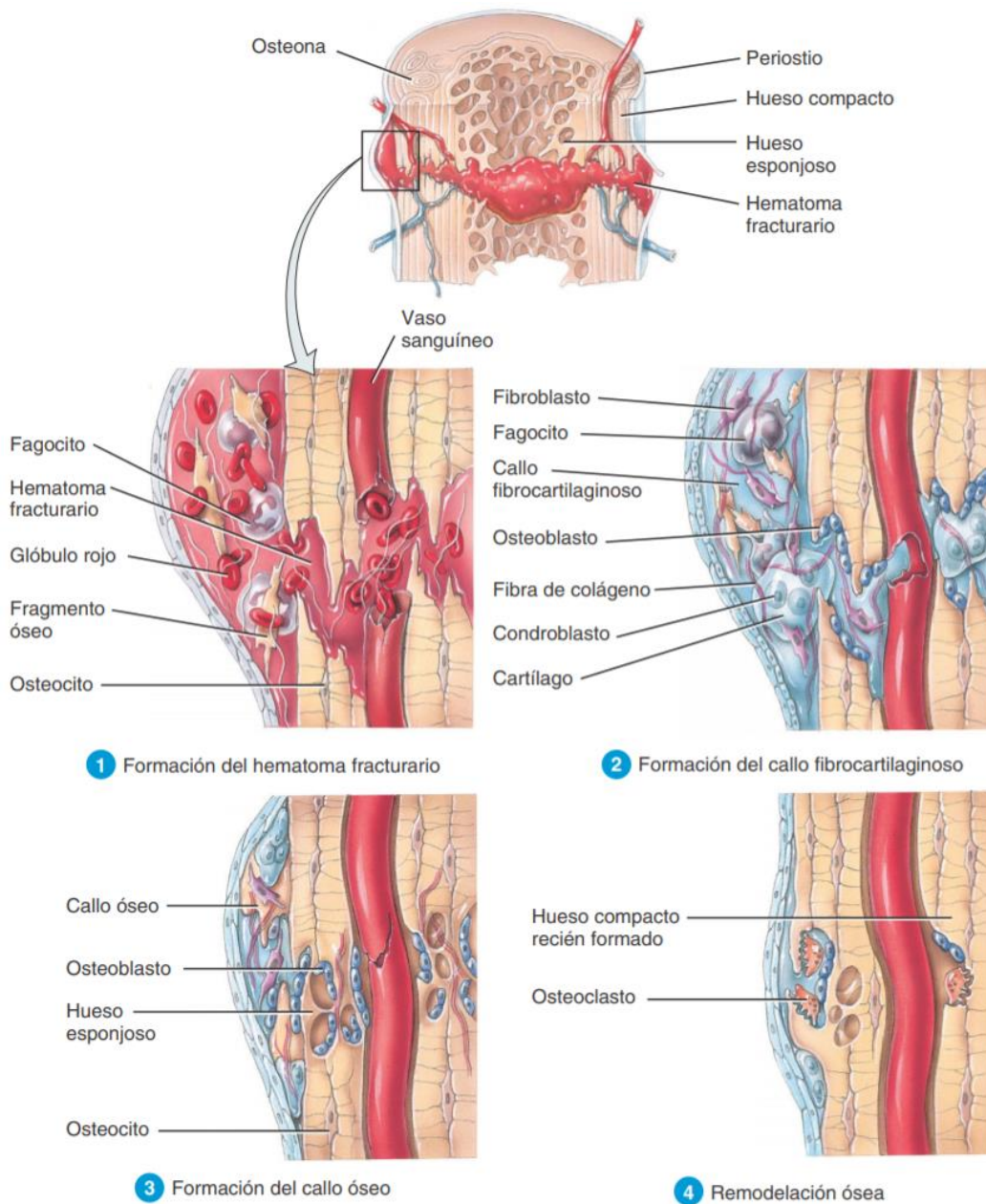


Imagen I.6. Consolidación de una fractura. Adaptado de Tortora [Tortora & Derrickson, 2017]

1.1.5 Lesiones del tejido óseo y tratamiento

El hueso es un órgano con funciones críticas para la fisiología humana, ya que no solo se encarga de la protección y soporte de otros tejidos, sino que también controla la homeostasis, regula el pH sanguíneo y aloja a múltiples células progenitoras. La importancia del hueso se observa en el caso de enfermedades como la osteoartritis y osteoporosis, en los que el tejido no funciona adecuadamente. Padecimientos tales como heridas traumáticas, cirugías ortopédicas y resección de tumores inducen defectos o huecos en el hueso. Los tratamientos para este tipo de lesiones tienen un impacto clínico y económico enorme, e involucran el gasto de cientos de millones de dólares en todo el mundo [Porter et al., 2009].

Las estrategias utilizadas para tratar el hueso dañado incluyen, la mayoría de las veces, la reparación ósea o su reemplazo. En muchas ocasiones, debido al tamaño del defecto óseo o por infecciones, el hueso dañado o enfermo no es capaz de repararse a sí mismo por fijación mecánica. En casos donde no se produce la unión ósea o existen lesiones de tamaño crítico, es necesaria la utilización de un material sustituto que rellene el defecto. Actualmente, el tratamiento más empleado consiste en la utilización de injertos de tejido autólogo (del mismo paciente), alogénico (de un donante de la misma especie) o xenogénico (tejido de un organismo de una especie diferente a la del receptor) [Porter et al., 2009].

Para que cualquier tipo de sustituto biológico pueda ser utilizado en la reparación de tejido óseo, es necesario que cumpla con ciertos requisitos. Estos incluyen la osteogénesis, que es la capacidad para generar hueso a partir de las células que se encuentran en el injerto; la osteoinducción, o la capacidad de inducir la progresión de células MSCs y células osteoprogenitoras hacia el linaje de osteoblastos; la osteoconducción, que facilita la creación de vasos sanguíneos y nuevos sistemas Harversianos además de transporte de nutrientes y células; y, finalmente, la osteointegración que describe la unión superficial entre el hueso receptor y el material implantado [Giannoudis et al., 2005].

Entre las distintas terapias que existen para el tratamiento de lesiones óseas se encuentran las aleaciones metálicas. Estas se han usado con el objetivo de producir prótesis, placas, tornillos y clavos; sin embargo, presentan varias desventajas. Las prótesis suelen aflojarse de su sitio debido a falta de osteointegración, las placas y tornillos requieren de una segunda intervención quirúrgica para su extracción y los implantes metálicos no son capaces de cambiar su forma a través del modelado y remodelado óseo para adaptarse a las nuevas necesidades del cuerpo. Sumado a esto, existe un gran porcentaje de estos tratamientos que desencadenan respuestas inmunogénicas, provocando infecciones y rechazo por el organismo [Agarwal & García, 2015].

En el caso de los autoinjertos, la cual es la técnica por elección, consiste en la remoción de hueso de la pelvis o la cresta ilíaca para rellenar el defecto y presenta óptima osteoconductividad, osteoinductividad y osteogenicidad. Sin embargo, en este tipo de práctica se han observado complicaciones en el 30% de los casos, los cuales incluyen aumento de morbilidad, dolor, parestesia, hospitalizaciones largas y rehabilitación, además de un incremento en las posibilidades de infecciones y hematomas. Por otro lado, los aloinjertos son los sustitutos más utilizados actualmente en la medicina debido a la existencia de bancos de conservación de órganos, pero presentan aún mayores limitaciones que los autoinjertos, con resultados clínicos variables. Este tipo de implante presenta un alto riesgo de transmisión de enfermedades virales, por lo que generalmente se los somete a un proceso de esterilización. Sin embargo, esto elimina la fase celular del injerto, excluyendo su capacidad osteogénica y afectando su fuerza estructural. Además, debido a las diferencias en compatibilidad, los pacientes deben recibir inmunosupresores para evitar el rechazo. Finalmente, los xenoinjertos también acarrear el riesgo de enfermedades, son de elaboración costosa y carecen de osteoinducción [Silber et al., 2003; Kretlow & Mikos, 2007].

En este contexto, debido a las desventajas presentadas en las terapias médicas actuales para el tratamiento de lesiones óseas, es que se ha visto motivado el desarrollo de una variedad de materiales que actúen como reemplazos biológicos. Las ventajas de este tipo de enfoque involucran la eliminación del riesgo a la transmisión de

enfermedades, menos intervenciones quirúrgicas y un aumento reducido en la infección o respuesta inmunogénica del paciente [Porter et al., 2009].

I.2 Tejido cartilaginoso

El tejido cartilaginoso es un tejido conjuntivo avascular compuesto por células denominadas condrocitos, con una matriz extracelular (MEC) muy especializada, que compone el elemento funcional de este tejido y corresponde a más del 95% del volumen de cartílago. La MEC del tejido cartilaginoso es sólida y firme, pero flexible. La composición de la misma es crucial para la supervivencia de los condrocitos y permite la difusión de sustancias desde los vasos sanguíneos del tejido conjuntivo circundante a los condrocitos dispersos dentro de la matriz, con lo que se mantiene la viabilidad del tejido. Según la composición de la matriz, se distinguen tres tipos de cartílago que difieren tanto en aspecto como en sus propiedades mecánicas: el cartílago elástico, el cartílago fibroso y el cartílago hialino. El cartílago elástico se encuentra principalmente en la epiglotis y el pabellón auricular, y presenta una gran elasticidad debido a un entretejido denso de finas fibras de elastina y fibrillas colágenas del tipo II. El cartílago fibroso o fibrocartílago es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino. Se compone de una combinación de fibras colágenas densamente agrupadas y células cartilaginosas ubicadas en lagunas y rodeadas por cantidades variables de matriz hialina. Aquí el colágeno es de tipo I, es decir, el mismo tipo que el tejido conectivo en general, mientras que el colágeno de la matriz hialina es de tipo II. Este tipo de cartílago aparece en la parte externa de los discos intervertebrales, o en las articulaciones de la clavícula y de la mandíbula. Por su parte, el cartílago hialino se localiza en las epífisis de los huesos que forman las articulaciones, en la laringe, tráquea, bronquios y en los extremos anteriores de las costillas y posee una MEC rica en fibras de colágeno tipo II y proteoglicano agregán. Además, provee una superficie de baja fricción y distribuye las fuerzas aplicadas al hueso subyacente. Cuando el cartílago hialino se encuentra cubriendo las articulaciones sinoviales (móviles), recibe el nombre de cartílago articular y carece de pericondrio [Ross & Pawlina, 2013; Geneser, 2006].

1.2.1 Composición del cartílago articular

El cartílago articular está compuesto por proteínas especializadas y macromoléculas que le permiten al tejido funcionar de manera adecuada en entornos con gran presión mecánica, como lo son las juntas articulares. El mismo está compuesto por dos fases, una líquida y otra sólida (Tabla I.1). En la primera se encuentra principalmente agua y representa entre el 60% al 80% del peso total húmedo del cartílago articular y contribuye en gran medida a sus características físicas y fisiológicas. Por otro lado, los restantes 20% a 40% corresponden a la fase sólida, compuesta principalmente por los componentes sólidos de la MEC y condrocitos [Zhang et al., 2009].

Cartílago articular		% Peso húmedo	% Peso seco	Función
<i>Fase sólida (MEC)</i>	<i>Colágeno</i>	Colágeno tipo II (15-20%) Otros colágenos < 2%	50-75%	Contribuye a las fuerzas de tracción y a la compartimentación celular
	<i>Proteoglicanos</i>	10%	20-30%	Contribuye a la resistencia a la compresión y a las propiedades viscoelásticas
	<i>Otras glicoproteínas, fibronectinas, etc.</i>	Pequeñas cantidades	Pequeñas cantidades	Contribuye a las interacciones células-MEC y a la estabilidad de MEC
<i>Fase sólida (células)</i>	<i>Condrocitos</i>	< 5-10% del volumen total del tejido	-	Modifica MEC y regula la extensión del tejido
<i>Fase líquida</i>	<i>Agua intersticial y electrolitos</i>	60-80%	-	Intercambia nutrientes con el fluido sinovial, lubrica las articulaciones y contribuye a la resistencia por compresión y deformación

Tabla I.1. Composición del cartílago articular. Tabla adaptada de Zhang [Zhang et al., 2009].

Los condrocitos, el único tipo celular existente en el cartílago articular y los responsables de la producción de la MEC, representan entre el 5% y el 10% del volumen total del tejido [Ethier & Simmons, 2007]. Estos pueden censar y responder a varios estímulos mecánicos tanto en su microentorno como en distintas zonas del cartílago articular. Los condrocitos maduros están completamente encapsulados en la MEC y no son capaces de migrar o proliferar de manera significativa, por lo que sus capacidades

regenerativas luego de algún daño en el tejido son limitadas [Ethier & Simmons, 2007; Ofek & Athanasiou, 2007].

La composición de la MEC es fundamental para que el tejido funcione en los rigurosos entornos mecánicos de las articulaciones, tal como es el caso de la rodilla, cadera y el tobillo; en donde el cartílago está expuesto constantemente a diferentes cargas mecánicas. El colágeno es la proteína principal de la matriz y es capaz de formar una red tridimensional de fibrillas cortas y bastante delgadas. La mayor parte de estas fibrillas está constituida por colágeno tipo II, que representa alrededor del 80% del colágeno total. Las mismas se alinean de acuerdo con la dirección de la carga soportada por el cartílago, proporcionando rigidez a la estructura. En menor medida, la matriz también está constituida por colágeno tipo IX, que facilita la interacción de las fibrillas con las moléculas de proteoglicanos de la matriz y además regula su tamaño; mientras que el colágeno tipo X las organiza en una red hexagonal tridimensional decisiva para la función mecánica eficaz. Finalmente, el colágeno tipo VI contribuye a la adhesión de los condrocitos al armazón matricial [Ross & Pawlina, 2013; Athanasiou et al., 2009]

Otro componente principal de la MEC del cartílago son los proteoglicanos, que están compuestos por una cadena central proteica a la cual se unen, de manera perpendicular, los glucosaminoglicanos (GAG). Estos últimos son hidratos de carbono formados por unidades repetidas de disacáridos altamente sulfatados y, por lo tanto, con carga negativa, lo que provoca la atracción de iones como el Ca^{+2} y el Na^{+} , favoreciendo la absorción de agua y ayudando al mantenimiento de las propiedades mecánicas y de hidratación de la MEC [Carballo et al., 2017]. Los principales GAG son el hialuronato, el condroitín sulfato y el queratán sulfato. Los dos últimos componen el proteoglicano más importante del cartílago articular, denominado agregán, mientras que el hialuronato se une no covalentemente a más de 300 moléculas del mismo para formar grandes aglomeraciones de proteoglicanos. Estas aglomeraciones están unidas a su vez con fibras de colágeno de la MEC por interacciones electroestáticas y glucoproteínas multiadhesivas, creando así una estructura molecular entrecruzada resistente a las fuerzas de tensión. Este tipo de estructura con muchos proteoglicanos mantiene la distancia entre las células y le confiere al tejido la resistencia adecuada a las fuerzas de compresión. La matriz cartilaginosa también contiene otros proteoglicanos

como la decorina, el biglicán y la fibromodulina que no forman agregados, sino que se unen a otras moléculas y contribuyen a estabilizar la matriz [Athanasiou et al., 2009; Ross & Pawlina, 2013]. En la Imagen I.7 se esquematiza la estructura molecular de la MEC del cartílago hialino.

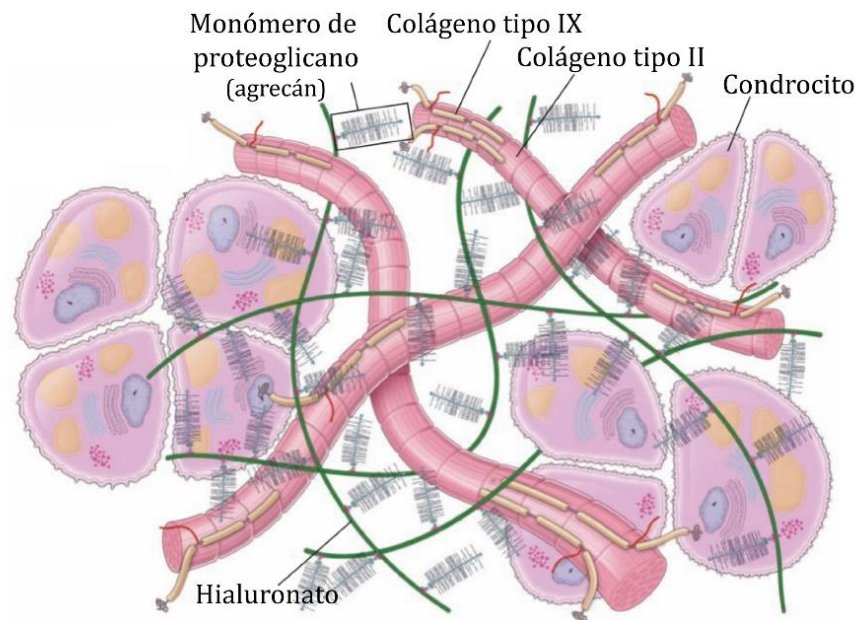


Imagen I.7. Estructura molecular de la matriz extracelular (MEC) del cartílago hialino.
Adaptado de Ross & Pawlina [Ross & Pawlina, 2013]

A lo largo de la vida, el cartílago sufre un continuo remodelado interno conforme los condrocitos reemplazan moléculas de la MEC que se pierden por degradación. Este recambio depende de la capacidad de estas células de sentir los cambios en la composición de la MEC, respondiendo con la adecuada síntesis de nuevas moléculas. De esta manera, la matriz actúa como un transductor de señales para los condrocitos inmersos en ella. Por lo tanto, las compresiones aplicadas al cartílago crean señales mecánicas, eléctricas y químicas que controlan las síntesis de las moléculas de la MEC por parte de los condrocitos. No obstante, a medida que el organismo envejece, la composición de la MEC cambia y los condrocitos pierden su capacidad de responder a estos estímulos [Ross & Pawlina, 2013].

1.2.2 Estructura del cartílago articular

El cartílago articular es un remanente del molde original de cartílago hialino del hueso en desarrollo y persiste durante toda la vida adulta. Como se ha mencionado

anteriormente, este cubre las superficies articulares de las articulaciones móviles y carece de pericondrio, un tejido conjuntivo denso y fibroso que es fuente de células cartilaginosas nuevas. El cartílago articular se divide en cuatro zonas: superficial, media (o transicional), profunda (o radial) y calcificada (Imagen I.8). Cada una de estas zonas varía en la composición de la matriz, en sus propiedades mecánicas y metabólicas, como también en la morfología de los condrocitos y su disposición en el tejido [Ofek & Athanasiou, 2007].

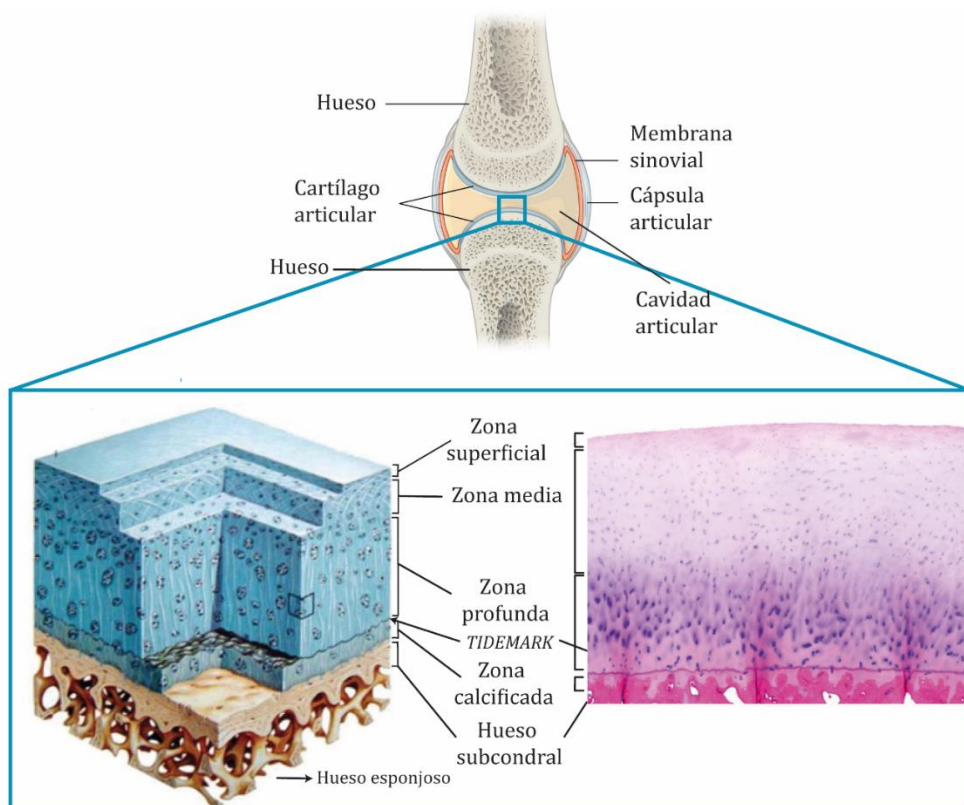


Imagen I.8. Estructura del cartílago articular. Imágenes adaptadas y extraídas de Netterimages.com (Elsevier) y de Jung, 2014 [Jung, 2014].

Comenzando desde la superficie articular, la zona superficial corresponde el 10%-20% del grosor total del cartílago, pero contiene la mayor densidad de colágeno del tejido. Al compararla con otras zonas, las fibras de colágeno son más delgadas y se encuentran densamente empaquetadas. A su vez, estas fibras rodean a condrocitos con morfología alargada y aplanada para formar láminas paralelas a la superficie y en dirección del esfuerzo de corte de la articulación [Flannery et al., 1999]. Además, la zona

superficial posee baja cantidad de proteoglicanos, baja permeabilidad y alta lubricación, lo que contribuye a la resistencia a la tracción del tejido.

La zona media resulta un tejido de transición entre la zona superficial y la profunda, y posee la mayor cantidad de contenido de proteoglicanos en el tejido. Además, a diferencia de la zona superficial, el contenido tanto de colágeno como de agua es menor y las fibras presentan un tamaño mayor con una disposición al azar en la matriz. Por otro lado, los condrocitos exhiben morfología redondeada con un mayor número de organelas. Esto le otorga al tejido un módulo de compresión alto, lo que permite una buena recuperación frente a los impactos que soportan las articulaciones.

Las fibras colágenas de la zona profunda son las más grandes en diámetro. Están organizadas en dirección radial, perpendicular a la superficie de la articulación, y se insertan al hueso subcondral adyacente, atravesando un “*tidemark*” (una línea visible que separa la zona profunda de la zona calcificada). La función principal del colágeno en esta zona es la de reforzar la unión entre el cartílago y el hueso [Buckwalter & Mankin, 1998; Buckwalter, 1991]. Los condrocitos están dispuestos en columnas paralelas a la organización de las fibras de colágeno y muestran una gran actividad sintética. Por otro lado, la zona de transición entre el cartílago articular y el hueso subcondral se denomina zona calcificada, que contiene algunos condrocitos inertes embebidos en una MEC calcificada. Esta es la única zona que contiene colágeno tipo X, que ayuda a la mineralización del cartílago y provee integridad estructural [Bhosale & Richardson, 2008].

1.2.3 Condrogénesis

La condrogénesis es el proceso de desarrollo del cartílago, que se origina a partir de condensaciones de células MSCs durante el desarrollo embrionario. Este proceso se inicia con el reclutamiento de las células MSCs hacia el sitio donde posteriormente se originarán los elementos del esqueleto. La expresión del factor de transcripción SOX-9 desencadena la diferenciación de estas células a condroblastos, los cuales secretan MEC rica en colágeno tipo II y proteoglicanos. De esta manera, los condroblastos se van separando progresivamente conforme depositan matriz a su alrededor y, una vez que el

material los ha rodeado por completo, reciben el nombre de condrocitos. Este molde cartilaginoso sufre posteriormente un proceso de osificación para dar paso a la formación de la mayor parte de los huesos del cuerpo humano, excepto en los extremos (zonas articulares) donde persistirá como cartílago articular [Bobick & Kulyk, 2008]. La diferenciación de las células MSCs a condrocitos durante la condrogénesis es modulada por factores de transcripción que controlan la expresión de las principales proteínas que componen la MEC del cartílago articular [Karsenty & Wagner, 2002]. Dentro de estos se destacan el SOX9, L-SOX5 y SOX6, que son factores de transcripción esenciales para la diferenciación de condroprogenitores y regulan la expresión de colágeno tipo II, IX y XI, y agregán [Demoor et al., 2014]. A su vez, también existen factores de crecimiento producidos por los condrocitos que regulan la integridad del cartílago durante la división celular y en caso de lesiones, tales como los factores transformantes del crecimiento tipo beta (TGF- β), proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento insulino similares (IGF), entre otros [Athanasίου et al., 2009; Vinatier et al., 2009; Panseri et al., 2012; Demoor et al., 2014].

1.2.4 Lesiones del cartílago articular y tratamiento

Los defectos en el cartílago articular, que son causados principalmente por traumatismos o enfermedades degenerativas en las articulaciones, son divididos en dos categorías: defectos parciales o defectos totales. En los defectos parciales, el daño se encuentra en la zona articular del cartílago sin penetrar al hueso subcondral, lo que hace al sitio de lesión un lugar inaccesible para las células de la sangre y hueso, o para las células progenitoras de la médula ósea [Hunziker, 1999]. De esta manera, el sitio con el defecto carece de cúmulos de fibrina y otras respuestas auto-reparativas. Además, aunque los condrocitos pueden comenzar a proliferar y sintetizar MEC inmediatamente después de la creación del defecto parcial, impulsando ciertas actividades enzimáticas y metabólicas, no hay suficientes condrocitos en el tejido que migren al sitio de lesión para reparar efectivamente la herida. Además, las actividades regenerativas de los condrocitos generalmente se detienen antes de que el defecto en el cartílago sea reparado, lo que resulta en una lesión que perdura en el tiempo y, por lo tanto, reduce

la función del tejido, sirviendo como punto de partida para la degeneración tisular [Hu, 2005; Hunziker, 1999].

Los defectos totales, u osteocondrales, penetran al cartílago articular en profundidad, más allá de la zona calcificada y hacia el hueso subcondral. A diferencia de las lesiones parciales, los defectos totales son accesibles para las CPMO, macrófagos y células de la sangre, todos tipos celulares involucrados en la respuesta inmune espontánea desencadenada luego de un daño en el tejido. En este caso, e inmediatamente después de generada la lesión, el hueco de la misma es llenado con cúmulos de fibrina y la respuesta inflamatoria se activa. Así, las CPMO migran hacia el defecto para reemplazar la fibrina y, luego de una semana, llenan por completo el sitio de lesión. Muchas de estas CPMO pueden diferenciarse en condrocitos que secreten una MEC rica en proteoglicanos que repare el tejido cartilaginoso dañado. Sin embargo, se ha observado de manera muy frecuente la presencia de cartílago fibroso (y no hialino) en los sitios de lesión, lo que implica la regeneración de tejido con propiedades mecánicas pobres y una mayor permeabilidad [Mano & Reis, 2007]. Esto provoca que el proceso de reparación de los defectos totales resulte transitorio e imperfecto, favoreciendo la degeneración del tejido que, eventualmente, se vuelve hipertrófico para finalmente ser reemplazado por una deposición progresiva de hueso subcondral. Esto implica, por lo tanto, que, aunque la condrogénesis puede ocurrir esporádicamente, rara vez se logra la recuperación completa del cartílago y, en su lugar, se desarrolla inflamación, dolor y discapacidad por la articulación entre huesos [Moisio et al., 2009; Burr, 2004].

Todo lo expuesto hasta el momento implica, por lo tanto, que las lesiones aisladas y no tratadas del cartílago articular pueden llevar a un daño grave del tejido y provocar fácilmente el desarrollo de enfermedades degenerativas del tejido cartilaginoso [Sgaglione et al., 2002, Gründer et al., 2004]. Es por ello que en los últimos años se ha producido un cambio en el paradigma, ya que antes se dejaban evolucionar las lesiones del cartílago hasta llegado el momento de realizar una sustitución articular completa. Actualmente, en lesiones menores a 2.5 cm² se utilizan las técnicas de microfractura, implantes y trasplantes.

I.2.4.1 Microfractura

La cirugía por microfractura es un método sencillo y rápido para tratar defectos pequeños. Esta técnica está inspirada en el proceso de reparación espontánea de los defectos totales en cartílago y busca crear microfracturas que atraviesen el hueso subcondral a través de perforaciones, afeitado o abrasión; lo cual provoca la liberación de CPMO para la posterior reparación del tejido (Imagen I.9). Este tipo de tratamiento es especialmente efectivo para defectos articulares pequeños (menores a 2 cm²), y resulta muy atractivo por su naturaleza mínimamente invasiva que incluye tiempos quirúrgicos y de recuperación muy cortos, además de baja morbilidad [Clair et al., 2009]. Debe ser tenido en cuenta, sin embargo, que la reparación del cartílago articular a través de la técnica de microfractura ha demostrado una gran variabilidad entre pacientes. En pacientes jóvenes, defectos tratados de manera temprana o lesiones pequeñas pueden verse favorecidas respecto de una mejor reparación del cartílago, particularmente porque las CPMO son más abundantes y activas en la juventud [Stolzing & Scutt, 2006]. Sin embargo, en otros casos, nulo o muy poco cartílago hialino es regenerado, y el cartílago hialino generado puede convertirse en fibrocartílago débil, lo que resulta en grandes tasas de fracaso y efectividad limitada para la microfractura.

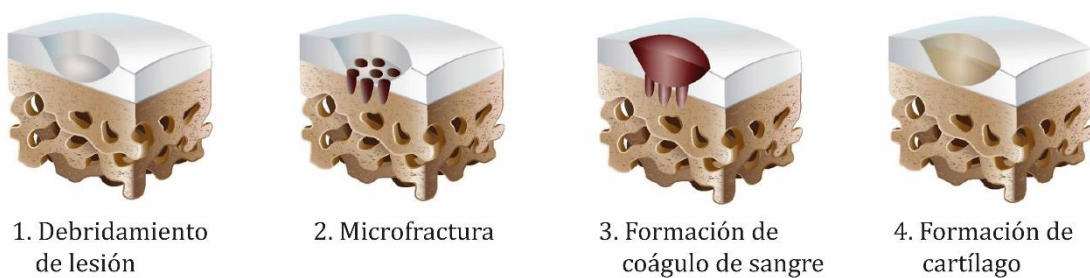


Imagen I.9. Representación de Microfractura. Adaptado de cartilage.org (International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society, ICRS).

I.2.4.2 Implantes

El implante de condrocitos autólogos (ACI, por sus siglas en inglés, *Autologous Chondrocyte Implantation*) se recomienda en pacientes con lesiones cartilagosas de entre 1 cm² a 12 cm² o para aquellos en donde la cirugía de microfractura ha fallado (Imagen I.10) [Gikas et al., 2009].

Esta técnica involucra dos cirugías. En la primera, una porción pequeña de cartílago sano es recolectado desde una zona de la rodilla del paciente que soporta poca carga. De este tejido se recuperan condrocitos que son expandidos *in vitro* y cultivados en monocapa durante 3 a 5 semanas para obtener un número suficientemente grande de células para su reimplantación. Es en la segunda cirugía cuando se inyectan las células en el sitio de lesión, y se utiliza un parche periosteal del hueso de la espinilla del paciente para cubrir y asegurar los condrocitos en el sitio dañado. Sin embargo, aunque se han reportado muchos resultados satisfactorios, esta técnica aún tiene limitaciones y desventajas. Por ejemplo, ACI es un procedimiento invasivo que involucra un gran periodo de recuperación y requiere múltiples cirugías para recolectar el cartílago sano, el parche periosteal y para reimplantar las células sanas [Chiang & Jiang, 2009]. Además, la reparación por este método puede resultar en fracaso debido a las probabilidades que existen de hipertrofia del periostio, de desdiferenciación de los condrocitos durante su cultivo *in vitro* o a causa de la disminución del número de condrocitos y su proliferación ligada al envejecimiento [Bobacz et al., 2004].

Por otro lado, existe otra técnica similar a ACI denominada Implante de condrocitos autólogos inducido por matriz (MACI, por sus siglas en inglés, *Matrix-induced autologous chondrocyte implantation*) que también requiere de dos procesos quirúrgicos (Imagen I.10). En el primero se recolecta el tejido autólogo y se aíslan los condrocitos, pero en lugar de cultivarlos por 5 semanas, estos se expanden *in vitro* y luego se cultivan por 3 días en una membrana obtenida a partir de una mezcla de colágenos (tipo I y III) derivada de porcinos, para su posterior implantación. Estas matrices están específicamente diseñadas para promover la infiltración de los condrocitos y disminuir la fricción en el sitio de lesión. Sin embargo, a pesar de los resultados prometedores tanto en casos clínicos como histológicos [Marlovits et al., 2012; Zheng et al., 2007], aún hacen falta más estudios para demostrar la superioridad de MACI sobre otras técnicas [Makris et al., 2015].

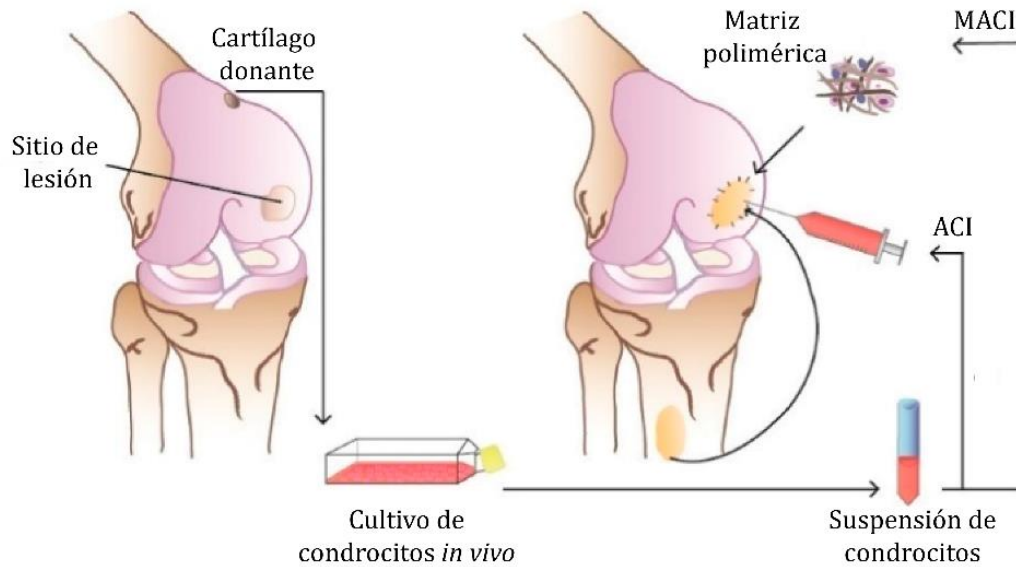


Imagen I.10. Representación de ACI y MACI. Adaptado de Jeuken [Jeuken et al., 2016].

I.2.4.3 Trasplantes

Los autoinjertos o injertos autólogos consisten en fragmentos de tejido de una zona sana del paciente para ser implantados en el área afectada, mientras que los aloinjertos son obtenidos de un sujeto de la misma especie, generalmente cadáveres.

Para el caso de autoinjertos osteocondrales, se recolectan tacos cilíndricos de tejido sano obtenido de la zona de la rodilla que soporta poca carga y se colocan en el sitio de lesión para restaurar la función (Imagen I.11). Aunque se han reportado resultados clínicos esperanzadores, con excelente integración del tejido asociada al autoinjerto, se han encontrado ciertas limitaciones. Las mismas incluyen morbilidad del sitio donante y cantidad insuficiente del tejido sano, tanto en calidad como cantidad; diferencias entre la superficie del implante y el lugar de la lesión, inestabilidad del injerto y baja tasa de supervivencia del tejido donante en un sitio que requiere alta resistencia a la fricción y fuerzas de carga, teniendo en cuenta que proviene de una región de baja capacidad de soporte [Clair et al., 2009]. Una técnica similar, denominada mosaicoplastia, utiliza pequeños tacos de autoinjertos osteocondrales, lo que tiene tres ventajas muy significativas: primero, se producen defectos más pequeños en el sitio donante y por lo tanto la morbilidad se ve reducida; segundo, un mayor número de sitios pueden ser utilizados para proveer tejido sano y, tercero, los tacos más pequeños

permiten construir una superficie lisa y prolija que se ajuste adecuadamente al sitio de lesión. Esta técnica ha demostrado resultados prometedores al tratar lesiones de cartílago articular de entre 1 a 4 cm² a corto, medio y largo plazo (Imagen I.12) [Revell & Athanasiou, 2008; Hangody et al., 2008; Solheim et al., 2010].



Imagen I.11. Representación de auto/aloinjerto de un único taco osteocondral. Adaptado de cartilage.org (International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society, ICRS).

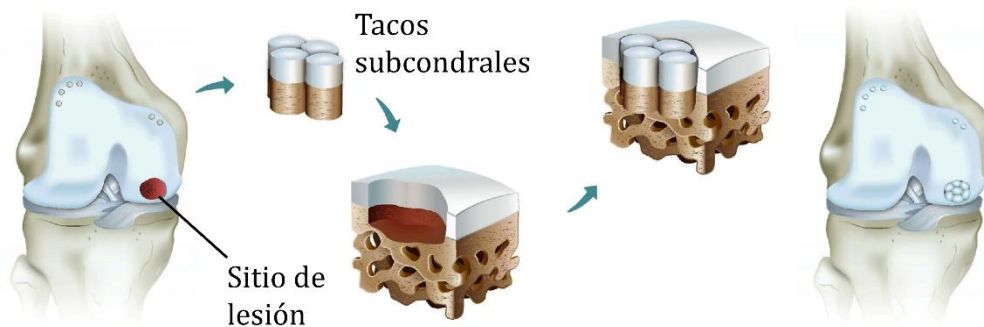


Imagen I.12. Representación de Mosaicoplastía. Adaptado de cartilage.org (International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society, ICRS).

Por otro lado, los aloinjertos osteocondrales se obtienen de bancos de tejido, lo cual evita largas cirugías y la morbilidad en el sitio donante, aliviando el suministro insuficiente de material que suele presentarse con los autoinjertos. Sin embargo, estos tejidos también muestran problemas a la hora de ser emparejados con el sitio de lesión, o incluso pueden inducir respuestas inflamatorias o de rechazo. Además, al poseer células muertas, el cartílago no es capaz de secretar proteínas para disminuir la fricción en las articulaciones.

Los tratamientos mencionados son deficientes e inconsistentes en la reparación a largo plazo; por otra parte, también presentan efectos secundarios indeseables y los

tratamientos se limitan generalmente a lesiones pequeñas, lo que hace que el resultado sea habitualmente inadecuado. Por tanto, se continúa en la búsqueda de opciones terapéuticas, donde la ingeniería de tejidos ha incursionado en el diseño y construcción de matrices (*scaffolds*), con fines terapéuticos para estimular la recuperación del tejido osteocondral.

I.3 Ingeniería de tejidos

Actualmente, se cree que la Ingeniería de tejidos es y seguirá siendo el foco de atención a la hora de investigar biomateriales. Esto es debido principalmente a la alta necesidad clínica de establecer terapias alternativas para tratamientos en caso de pérdida de tejido o fallas de órganos esenciales, ya que los trasplantes están frecuentemente limitados por la escasez de donantes y el alto riesgo de rechazo o transferencia de enfermedades.

Los materiales convencionales han sido útiles en el pasado, mejorando la calidad de vida de muchos pacientes con la utilización, por ejemplo, de prótesis. Sin embargo, está claro que aún no se encuentra disponible un material adecuado que sea capaz de cumplir con las funciones básicas de los tejidos, tales como el hueso, cartílago, segmentos óseos lagos o incluso órganos complejos. Actualmente, los biomateriales sintéticos sólo representan el 10% del mercado, mientras que los autoinjertos rondan el 50% del mismo [Gomes & Reis, 2004]. Por lo tanto, a pesar de los enormes beneficios que ha conseguido la tecnología de los últimos años, estas aplicaciones aún se encuentran muy limitadas y por ello la Ingeniería de tejidos se ha dirigido al desarrollo de técnicas híbridas, combinando la ciencia de los materiales con la biotecnología, para crear sustitutos biológicos que restauren/reparen, mantenga o mejoren la función biológica de un tejido u órgano dañado [Shalak & Fox, 1988].

El método más común para la creación de este tipo de sistema fue reportado por Langer y Vacanti y consiste en la utilización de tres componentes: las células, los factores de crecimiento y los *scaffolds*; que se denominan así porque actúan tanto como soporte estructural para las células, encargadas de regenerar el tejido, como soporte mecánico para el sitio de lesión [Langer & Vacanti, 1993]. El método consiste en crear un injerto

utilizando un material adecuado, cargado de células y moléculas bioactivas asociadas con el tejido a reparar para su posterior implante en el sitio de lesión. Idealmente, luego de la maduración del injerto e integración en el tejido, su objetivo es lograr la restauración completa de la herida (Imagen I.13).

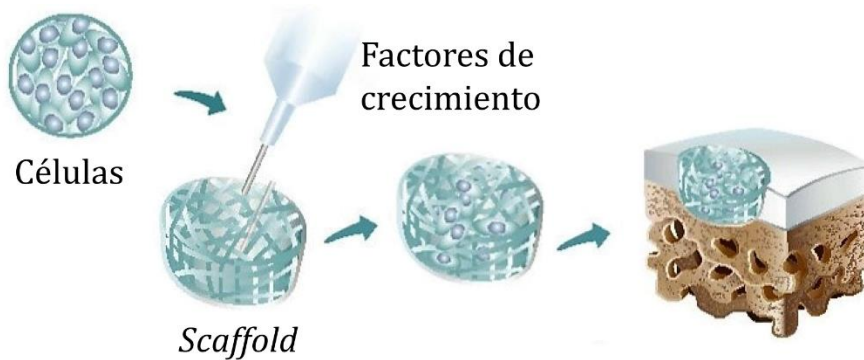


Imagen I.13. Representación de un implante en Ingeniería de tejido cartilaginoso. Adaptado de cartilage.org (International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society, ICRS).

Los componentes de la triada deben cumplir con una serie de requisitos que tendrán que ser tenidos en cuenta a la hora de buscar un sustituto biológico adecuado para la regeneración de tejido. Entre ellos se encuentra la selección, aislamiento y método de cultivo de las células; el diseño adecuado del *scaffold*, que involucra tanto la selección del material como su síntesis, el análisis de su porosidad, interconectividad, hidrofiliidad y características superficiales, biocompatibilidad, citotoxicidad, inmunogenicidad y genotoxicidad; hasta el uso adecuado de modelos animales que permitan evaluar la eficacia de los distintos enfoques, así como las distintas combinaciones de sus componentes (matrices/células/condiciones de cultivo *in vitro*) [Mano & Reis, 2007].

1.3.1 Células

Uno de los enfoques más estudiado en la Ingeniería de tejido consiste en el aislamiento, expansión y posterior cultivo de células *in vitro* sobre el *scaffold* para su posterior implante en el sitio de lesión. Por este motivo, la correcta selección de la fuente celular es fundamental. La utilización de cultivos primarios, derivados de los tejidos sanos del propio paciente (células autogénicas) es una elección obvia, ya que evita muchos de los problemas asociados al rechazo inmunológico provocado por

tejidos foráneos. Sin embargo, estas células no siempre se encuentran disponibles en cantidades suficientes para su uso inmediato y su cultivo *in vitro* puede tomar entre días y semanas, dependiendo del tipo celular. Las células de cultivos primarios derivados de donantes de la misma (células alogénicas) o de diferente especie (células xenogénicas) se encuentran, en teoría, en cantidades suficientes debido al número de potenciales donantes y a la criopreservación. Sin embargo, en estos casos, existe un gran riesgo de transmisión de enfermedades o rechazo causado por el sistema inmune del huésped [Kost & Langer, 2012; Malafaya et al., 2002]. Estas limitaciones podrían sobreponerse con el uso de líneas celulares, pero este tipo de cultivo inmortalizado ha demostrado propiedades neoplásicas que muestran una predisposición a formar tumores en el paciente [Lanza et al., 2011].

Actualmente, el uso de células progenitoras de tejidos resulta ser la alternativa más eficaz para la regeneración tisular, dado que pueden obtenerse en cantidades adecuadas y ser expandidas *in vitro*. Estas células, aunque se encuentran parcialmente diferenciadas, poseen la potencialidad suficiente como para dar origen a distintos tipos celulares [Langer & Vacanti, 1999; Pedersen, 1999]. Tal es el caso de las células progenitoras de médula ósea (CPMO) que, bajo las condiciones adecuadas, pueden diferenciarse a células de tejido óseo, cartilaginoso y ligamentos, entre otros [Cancedda et al., 2003]. Además, tanto el ambiente bioquímico como mecánico gobiernan la diferenciación de las CPMO, por lo que las propiedades estructurales de un *scaffold* pueden mejorar de manera significativa la supervivencia y proliferación de las mismas [Potier et al., 2010; Thompson et al., 2015].

1.3.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son citoquinas secretadas por diversos tipos celulares que funcionan como moléculas de señalización. La unión de estas a su receptor inicia una cascada de señalización intracelular que puede derivar en diferentes eventos, tal como la promoción de la adhesión celular, proliferación, migración y diferenciación por la regulación de la síntesis de diferentes proteínas y receptores [Rose & Oreffo, 2002].

La incorporación de estos factores puede realizarse de manera sistémica o por inyección al sitio del defecto, pero también pueden incluirse dentro del propio *scaffold* para crear un sistema de liberación controlada. Algunos de los factores de crecimiento estudiados para su aplicación en Ingeniería de tejido óseo y cartilaginosa son: los factores transformantes de crecimiento tipo beta (TGF- β), factores de crecimiento insulino similares (IGF), proteínas morfogénicas óseas (BMP) o factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) [Zhang et al., 2009; Mano & Reis, 2007].

1.3.2.1 Ranelato de estroncio (RaSr)

Debido a su capacidad de actuar como agente anti-osteopórico de doble acción, el ranelato de estroncio resulta un muy buen candidato para su utilización en Ingeniería de Tejido Óseo como droga estimuladora de la regeneración tisular.

Tratamientos con este compuesto han demostrado una reducción en el riesgo de fracturas vertebrales y de cadera [Cooper et al., 2012]. El mismo se incorpora a los cristales de hidroxiapatita y ha demostrado tener un efecto sobre la proliferación de los osteoblastos. Además, en este tipo celular activa a la enzima ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) que cataliza la síntesis de prostaglandina E2, que a su vez interviene en los procesos de carga mecánica y reparación de fractura. Además, se ha demostrado que aumenta la expresión de osteoprotegerina (OPG) y disminuye la de RANKL, lo que implica una inhibición de la osteoclastogénesis. A su vez, aumenta la expresión de Runx-2 y sialoproteína ósea, lo cual implica un consecuente estímulo de la diferenciación osteoblástica [Marie, 2008; Chattopadhyay et al., 2007]. También se ha reportado que favorece la diferenciación y supervivencia de osteocitos [Hamdy et al., 2009]. Por otro lado, en los osteoclastos el efecto encontrado es inhibitorio. La presencia de RaSr inhibe el reclutamiento de este tipo celular al sitio de acción y su posterior actividad, también demostrando efectos apoptóticos [Hamdy et al., 2009; Hurtel- Lemaire et al., 2009].

Esto implica, por lo tanto, que el ranelato de estroncio inhibe la actividad osteoclástica, disminuyendo la resorción ósea y estimula la actividad osteoblástica, incrementando, por lo tanto, la formación de hueso.

1.3.3 Scaffolds

Los *scaffolds* utilizados en Ingeniería de tejido deben cumplir con un determinado número de criterios para funcionar adecuadamente como promotores de la regeneración tisular. Estos parámetros involucran aspectos tanto fisicoquímicos como biológicos. Un atributo crítico de estas matrices es su biocompatibilidad, que relaciona la habilidad del material de existir dentro del organismo sin dañar las células adyacentes o crear una respuesta inmune, integrándose correctamente al tejido que lo rodea. Además, los *scaffolds* deben proveer un ambiente que imite la matriz extracelular, proveyendo soporte estructural tanto para el tejido regenerado como para los tejidos del entorno permitiendo a su vez la adhesión, migración y diferenciación celular [Panseri et al., 2012]. Independientemente del tejido en consideración, las matrices deben ser biodegradables e, idealmente, equiparar la velocidad de degradación con la velocidad de producción de MEC. Un requisito no menor es su accesibilidad de fabricación, factibilidad para esterilizar y potencial de comercialización. Por lo tanto, el desarrollo de *scaffolds* para su aplicación en Ingeniería de tejido requiere la comprensión de las interacciones existentes entre polímeros, estructuras y células [Bose et al., 2012; Carrow & Gaharwar, 2015]

Las propiedades de las matrices dependen principalmente de la naturaleza del material y del proceso de fabricación. La naturaleza de los biomateriales ha sido extensamente estudiada y se ha categorizado en tres grupos principales [Mano & Reis, 2007; Panseri et al., 2012]:

- I. Polímeros naturales. Son aquellos obtenidos de fuentes naturales, tanto de animales como vegetales y muchos de ellos se caracterizan por su buena biocompatibilidad y capacidad de imitar el entorno natural de los tejidos, pero poseen propiedades mecánicas pobres. Los polímeros naturales más conocidos incluyen proteínas de la MEC como el colágeno y GAGs, polipéptidos y polisacáridos tales como el quitosano, ácido hialurónico y el alginato.
- II. Polímeros sintéticos. Poseen la ventaja de crear un amplio rango de materiales debido a sus propiedades químicas y variedad de

procesamiento, aunque suelen poseer baja biodegradabilidad y en algunos casos pueden resultar tóxicos para las células. Los más comúnmente utilizados son el poliláctico, poli(etilenglicol) y poli(ϵ -caprolactona), entre otros.

- III. Cerámicos, biovidrios y materiales inorgánicos compuestos. Se trata de compuestos inorgánicos no metálicos capaces de favorecer la mineralización de los tejidos. Sin embargo, a pesar de mostrar una buena resistencia a la compresión, este tipo de materiales poseen una baja resistencia a la fractura y biodegradabilidad. Los más conocidos son la hidroxiapatita, la alúmina y el Bioglass® 45S5.

Puede observarse, por lo tanto, que la utilización de un único material no parece ser suficiente para lograr un *scaffold* que posea todas las propiedades mencionadas anteriormente. Es por ello que varios autores han propuesto como alternativa el diseño de matrices compuestas de polímeros sintéticos y naturales [Gomes et al., 2008; Panseri et al., 2012], con el objetivo de que la mezcla exhiba una combinación de las propiedades de los materiales primarios [Chen et al., 2008]. De esta manera, con la selección adecuada de polímeros, aumentan las posibilidades de lograr un sustituto biológico que permita reunir las características necesarias para la regeneración de un tejido particular. Es por este motivo que la creación de hidrogeles y/o matrices semi-interpenetradas se considera como una de las estrategias más eficientes para su aplicación en Ingeniería de Tejido [Mano & Reis, 2007; Lee & Mooney, 2001; Drury & Mooney, 2003].

I.1.3.3.1 Alginato

Particularmente, el alginato es un polisacárido natural aniónico y no ramificado obtenido de algas pardas o bacterias, ampliamente investigado para su uso en una gran cantidad de aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, relativo bajo costo y capacidad de gelación cuando se lo entrecruza con cationes divalentes. Los hidrogeles de alginato pueden ser preparados mediante varios métodos de entrecruzamiento y, su estructura similar a las matrices extracelulares de los tejidos, le permite ser utilizado en un amplio rango de tratamientos que van desde el curado de heridas y la liberación de agentes bioactivos (como pequeñas drogas y proteínas), hasta

el trasplante celular. Una de las ventajas de la utilización de alginato como *scaffold* es que permite mantener un entorno húmedo, minimizando las infecciones en el sitio de lesión. Determinadas drogas pueden ser liberadas desde el polímero de manera controlada, dependiendo del tipo y método de entrecruzamiento [Venkatesan et al., 2015]. Además, los materiales a base de alginato, en muchos casos, pueden ser administrados por vía oral o inyectados en el organismo a través de métodos mínimamente invasivos, lo que da lugar a una gran cantidad de aplicaciones en el área farmacéutica. A su vez, este material resulta prometedor para el trasplante de celular en Ingeniería de Tejidos. Con este enfoque, los hidrogeles pueden ser utilizados para liberar células en un sitio específico, dando lugar a la formación de nuevos tejidos, aportando estructura al lugar de regeneración [Lee & Mooney, 2012].

1.3.3.2 Hidrogeles semi-interpenetrados

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales con componentes hidrofílicas capaces de retener grandes cantidades de agua, o fluidos biológicos, caracterizados por una consistencia viscoelástica similar a varios tejidos [Hoffman, 2012; Peppas et al., 2000]. Los mecanismos de unión de las cadenas poliméricas para formar una red en tres dimensiones pueden incluir entrecruzamiento iónico y/o covalente. El primero consiste en el entrecruzamiento de polímeros con iones multivalentes que, aunque se trata de una manera sencilla de formar hidrogeles, estos pueden ser intercambiados por otras moléculas iónicas en entornos acuosos, resultando en un deterioro rápido y sin control de las propiedades originales del material, obteniéndose así un *scaffold* con baja estabilidad. Por otro lado, el entrecruzamiento covalente es un método preciso para controlar la densidad de los hidrogeles, sin embargo, la baja degradabilidad del material puede resultar contraproducente para la mayoría de las aplicaciones en Ingeniería de tejidos (Imagen I.14) [Lee & Mooney, 2001].

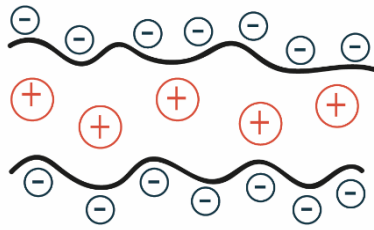
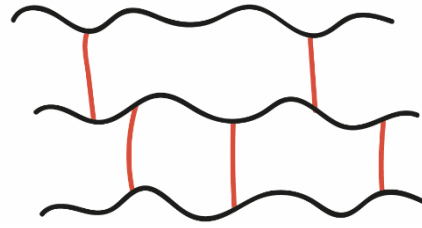
Entrecruzamiento iónico**Entrecruzamiento covalente**

Imagen I.14. Esquema representativo de tipos de entrecruzamiento.

Un parámetro importante en el diseño de hidrogeles está relacionado a sus propiedades mecánicas, ya que el material debe crear y mantener un espacio para el desarrollo tisular. Estas propiedades dependen principalmente en la rigidez original de las cadenas de polímero, de la densidad de entrecruzamiento y del hinchamiento como resultado del balance de componentes hidrofílicos/hidrofóbicos [Lee et al., 2000]. Otro aspecto a tener en cuenta es la degradación, independientemente de si los hidrogeles son sintetizados a partir de fuentes naturales o sintéticas, ya que generalmente se busca coordinar la tasa de degradación del *scaffold* con el tiempo de regeneración del tejido a estudiar [Lee et al., 2000]. Por estos motivos mencionados anteriormente, es que los hidrogeles formados por un solo polímero son considerados alternativas limitadas y, en su lugar, se propone el diseño de redes de multicomponentes denominadas redes poliméricas interpenetradas (IPNs, por sus siglas en inglés, *interpenetrating polymer networks*) [Dragan, 2014].

Las IPNs son mezclas de polímeros entrelazados en la que al menos uno es sintetizado y/o entrecruzado en la presencia del otro, lo cual da origen a distintos tipos de redes, denominadas interpenetradas (IPN) y semiinterpenetradas (sIPN). Las redes poliméricas denominadas IPN son una combinación de dos o más polímeros formando una red covalentemente unida [Sperling, 1994]. La combinación de los polímeros produce un sistema multicomponente con propiedades sobresalientes debido al efecto sinérgico inducido por la interpenetración forzada de los componentes [Kim et al., 2004] [Sperling, 1994]. Por otro lado, las redes poliméricas denominadas sIPN, se componen de dos polímeros, uno lineal y otro entrecruzado.

De acuerdo con la química de la preparación, las redes pueden ser sintetizadas de manera simultánea, cuando los precursores se mezclan y las dos redes son sintetizadas al mismo tiempo por rutas distintas de polimerización [Myung et al., 2008; Sperling, 2005; Kim et al., 2004]; o mediante síntesis secuencial, generalmente llevado a cabo al embeber una red de hidrogel simple en una solución con una mezcla de monómero e iniciador, con o sin entrecruzante. Si existe la presencia de un entrecruzante, el resultado es una IPN completa, mientras que la ausencia del mismo genera una red con polímeros lineales atrapados en ella (sIPN) (Imagen I.15). Varios autores también refieren como sIPN (o pseudo-IPN) a aquellos materiales en los cuales un componente es lineal dentro de una estructura de red polimérica, independientemente de su método de síntesis [Myung et al., 2008; Sperling, 1994; Chivukula et al., 2006; Hoare & Kohane, 2008].

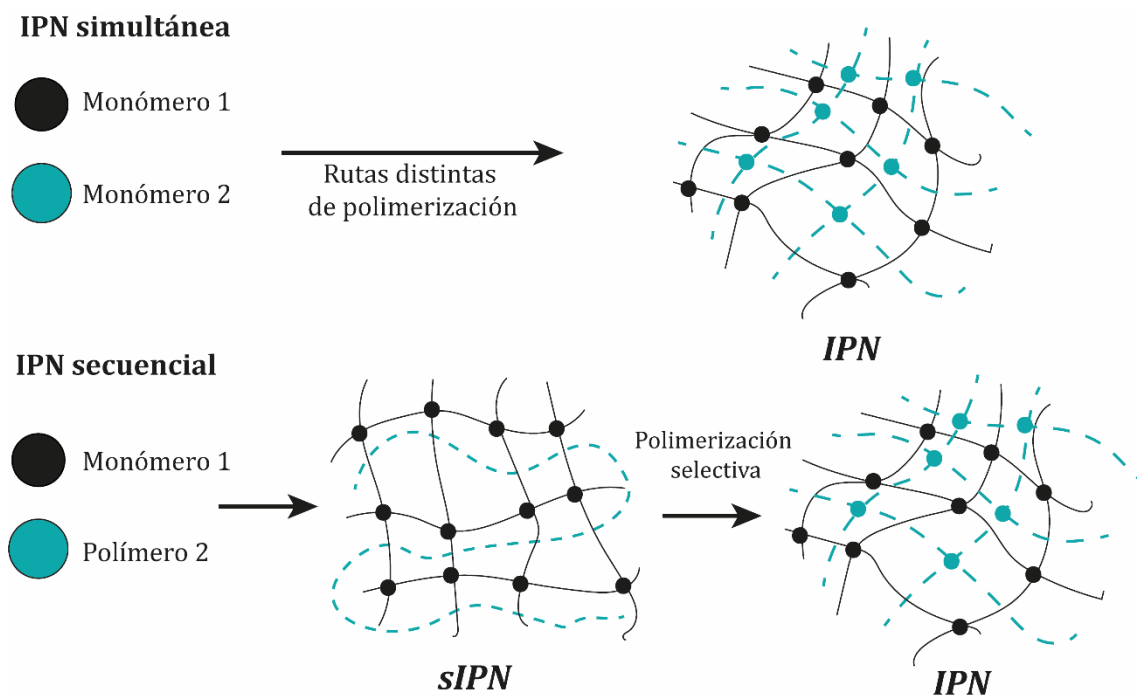


Imagen I.15. Representación de la formación de redes poliméricas interpenetradas (IPN).

En resumen, debido a que hasta el presente no existe ningún material que reúna todos los requerimientos necesarios en un *scaffold*, en este trabajo de tesis tomamos el desafío de diseñar un nuevo material basado en alginato de sodio para su utilización como implante en Ingeniería de Tejido Óseo y Cartilaginoso.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1 HIPÓTESIS

En este trabajo de tesis se propone el desarrollo de hidrogeles basados en alginato de sodio con Sr^{+2} que actuarán como sistema de liberación para favorecer la regeneración de tejido óseo. A su vez, la incorporación de alginato de sodio a hidrogeles obtenidos a partir de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y etilenglicol dimetacrilato (EGDMA), mejorará la biocompatibilidad de las matrices, permitiendo su aplicación como implantes en la regeneración de daños en el tejido óseo y cartilaginoso.

II.2 OBJETIVOS

II.2.1 Objetivo General

El Objetivo General de esta tesis doctoral es el desarrollo de hidrogeles basados en alginato de sodio que permitan la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso.

II.2.2 Objetivos específicos

1. Extraer, purificar y caracterizar alginato de sodio a partir de una fuente natural y comercial.
2. Desarrollar hidrogeles de alginato entrecruzados iónicamente con estroncio (Sr^{+2}) para su utilización como biomateriales para Ingeniería de Tejido Óseo.
3. Evaluar el sistema de liberación de Sr^{+2} desde los hidrogeles obtenidos.
4. Diseñar, caracterizar y evaluar las propiedades de hidrogeles poliméricos combinando un polímero sintético (HEMA) y alginato de sodio, que puedan ser empleadas para la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso.
5. Evaluar la biocompatibilidad de las matrices desarrolladas empleando células progenitoras de médula ósea (CPMO) y un cultivo primario de condrocitos.
6. Investigar la producción de marcadores osteogénicos en CPMO crecidas y diferenciadas sobre las matrices.
7. Investigar la producción de marcadores condrogénicos con condrocitos primarios crecidos sobre las matrices.
8. Evaluar de la citotoxicidad de los biomateriales desarrollados empleando un modelo de macrófagos murinos en cultivo.
9. Evaluar *in vivo* la capacidad del material desarrollado para regeneración ósea.

CAPÍTULO III:

**Extracción, purificación
y caracterización
de alginato de sodio**

III.1 INTRODUCCIÓN

Los polímeros son macromoléculas sintéticas o naturales formadas por la unión de un gran número de subunidades denominadas “monómeros”. Debido a que poseen una composición, naturaleza química y arquitectura muy variada, este tipo de macromolécula puede generar un amplio espectro de materiales con diferentes características. A su vez, la combinación de polímeros sintéticos y naturales permite adaptar las propiedades del material resultante a las necesidades del campo de aplicación que, de otra manera, mediante el uso individual de los polímeros, no podría alcanzarse.

Los polímeros representan el grupo más amplio de biomateriales debido a su versatilidad, y se ha estudiado una amplia variedad de combinaciones para su utilización en Ingeniería de Tejido [Gunatillake & Adhikari, 2003; Nair & Laurencin, 2005]. Se ha demostrado que una gran cantidad de polímeros naturales son sumamente relevantes en el campo de los biomateriales y principalmente para la Ingeniería de Tejido Óseo (ITO) y Cartilaginoso (ITC) tales como el colágeno, el ácido hialurónico, polihidroxialcanoatos, el quitosano y el alginato. Por otro lado, los polímeros sintéticos más comúnmente utilizados varían desde materiales hidrofóbicos y no absorbentes de agua tales como el poli(etileno) (PE), poli(propileno) (PP) y goma silicona (SR) a polímeros más polares con capacidad de hinchamiento en agua como poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(etilenglicol) (PEG), poli(alcohol vinílico) y poli(hidroxietilmetacrilato) (PHEMA) [Ratner et al., 2004]. Como el objetivo principal de la utilización de biomateriales es mejorar la salud humana a partir de la restauración de la función natural de los tejidos y órganos dañados del cuerpo, es un requerimiento esencial que el producto final posea una buena biocompatibilidad y no genere una respuesta inmune ni efectos tóxicos [Park & Lakes, 2007].

III.1.1 Alginato

El alginato es el principal componente estructural de algas pardas marinas y puede ser sintetizado por bacterias tales como *Azobacter vinelandii* y *Pseudomonas* spp., en forma de un exopolisacárido. Es un polisacárido polianiónico altamente

hidrofílico que ha sido extensamente estudiado en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja citotoxicidad, bajo costo de obtención y por su capacidad de formar hidrogeles en presencia de iones divalentes como Ca^{+2} [Stevens et al., 2004; Kuo & Ma, 2001]. Los hidrogeles de alginato pueden ser obtenidos por varios métodos de entrecruzamiento y su similitud estructural con la matriz extracelular de tejidos vivos permite su aplicación en sistemas de liberación de agentes bioactivos. Además, su capacidad de mantener un microambiente fisiológicamente húmedo y de minimizar infecciones bacterianas lo hacen un material apto para su utilización como *scaffold* en aplicaciones tales como Ingeniería de Tejidos [Langer & Vacanti, 1993; Stevens et al., 2004].

La estructura química del alginato consiste en bloques de copolímeros lineales de los monómeros β -D-ácido manurónico (M) y α -L-ácido gulurónico (G) unidos mediante enlaces (1-4). Los bloques están compuestos por residuos consecutivos G (GGGG), residuos consecutivos M (MMMM) y residuos alternados M y G (MGMG) (Imagen III.1). Los alginatos extraídos de diferentes fuentes varían en su contenido de M y G, así como en el tamaño de cada bloque y peso molecular [Tønnesen & Karlsen, 2002]. La composición (relación M/G), secuencia, largo de los bloques G y el peso molecular son factores cruciales que afectan las propiedades del alginato y su hidrogel resultante [George & Abraham, 2006].

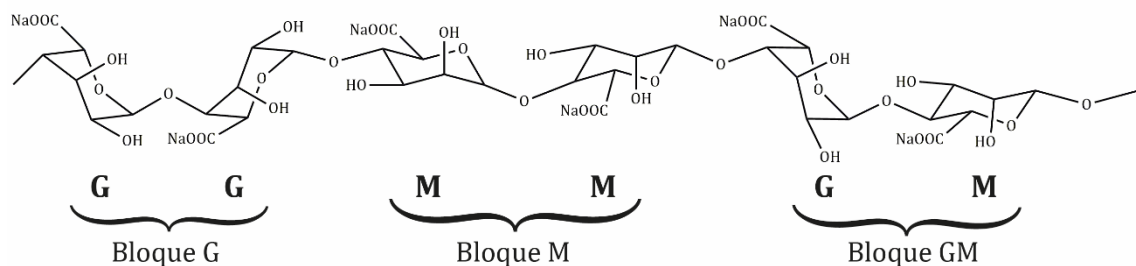


Imagen III.1. Estructura química de los bloques de alginato.

Debido a la variabilidad presente en el alginato, ya sea por su origen como por el método de empleo utilizado en su extracción; la biocompatibilidad del polisacárido no está garantizada [Orive et al., 2006]. La mayoría de los alginatos comerciales son

preparados utilizando mezclas de algas marinas de distintas especies, que pueden ser producidas exclusivamente para su cosecha o ser obtenidas directamente de costas, lo cual puede involucrar el arrastre de otros organismos o cuerpos extraños [Zimmermann et al., 1992; Tam et al., 2011]. A su vez, las algas pardas (fuente de alginato) contienen muchos compuestos polifenólicos y proteínas que pueden ser difíciles de remover en el proceso de extracción, lo cual puede derivar en una disminución de la biocompatibilidad del material. Es por este motivo que, antes de que el alginato pueda ser utilizado para aplicaciones biomédicas, debe ser purificado apropiadamente para minimizar el riesgo de desencadenar una respuesta inmune y toxicidad por compuestos tales como proteínas, endotoxinas y polifenoles; los cuales resultan ser los principales contaminantes del polímero en estado crudo.

En este trabajo de tesis se utilizó el alga parda *Undaria pinnatifida* como materia prima para la extracción de alginato. Esta alga es nativa del noroeste de Asia (Japón, China, Korea) donde es intensamente cultivada para consumo humano y, recientemente, ha invadido varias regiones del mundo como el Mediterráneo, las costas Atlánticas de Europa, Tasmania, la Costa Sur de Australia, Nueva Zelanda, la Costa Pacífica de Norte América y la Costa Atlántica de América del Sur [Dellatorre et al., 2014; Apoya et al., 2002]. Particularmente en este último caso, *Undaria pinnatifida* ha invadido las playas de la Patagonia Argentina por medio de la navegación, en su mayor parte, debido a que se quedan adheridas en los cascos de los barcos o son descargadas junto con el agua de lastre [Martin & Cuevas, 2006]. Este proceso genera rápidas modificaciones en el ecosistema local, generalmente dominando las comunidades nativas de algas [Irigoyen et al., 2011]. En 1992 se encontró a la primera colonia de *Undaria* en el sudoeste de las costas Atlánticas, en Golfo Nuevo, norte patagónico [Casas & Piriz, 1996]. Esta región es ecológicamente sensible, por lo que la existencia del alga genera preocupación en la zona. A pesar de que su presencia aumenta la diversidad y abundancia de la macrofauna del mar patagónico, produce un efecto negativo que induce cambios en el comportamiento de los peces en las costas usadas para buceo recreacional [Irigoyen et al., 2011]. Además, el alga afecta el atractivo de las playas de Puerto Madryn por las grandes cantidades de biomasa que quedan en la costa (5kg/m² en Golfo Nuevo) y, por lo tanto, al turismo de la zona [Eyras & Sar, 2003; Piriz et al.,

2003]. En este escenario, es improbable que *Undaria pinnatifida* pueda ser erradicada de las costas de la Patagonia. En su lugar, en un intento de controlar la invasión, esta puede ser considerada como una fuente potencial de biomasa para la industria alimenticia, biomédica y farmacéutica. En ese sentido, es interesante explorar el uso de alginato obtenido de esta alga invasora como materia prima para el desarrollo de *scaffolds* para su utilización en Ingeniería de Tejido Óseo.

En este capítulo se describen los estudios sobre la purificación de muestras alginato extraídos del alga parda *Undaria pinnatifida* y de origen comercial, para la posterior caracterización y evaluación de su efecto sobre la biocompatibilidad del material.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 Reactivos y drogas

- Solventes: formaldehído (36.5-38%, Cicarelli), etanol (96%, Biopack), ácido clorhídrico (HCl 37%, Anedra), cloroformo (99%, Cicarelli), butanol (99.4%, Sintorgan), ácido acético glacial (99.5%, Anedra).
- Sales: carbonato de sodio (Na_2CO_3 99.9%, Merck), cloruro de calcio (CaCl_2 93%, Cicarelli), cloruro de sodio (Anedra).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (2N, Biopack)
- Cultivo celular: medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM. En polvo, alto en glucosa, con L-glutamina y rojo de fenol. Sin HEPES, piruvato de sodio ni bicarbonato de sodio), Gibco[®], Thermo Fisher Scientific. (Buenos Aires, Arg.). Suero Fetal Bovino (SFB), Natacor (Córdoba, Arg.). Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Biopack, (Buenos Aires, Arg.). Tripsina – EDTA, Gibco[®], Thermo Fisher Scientific (Buenos Aires, Arg.). Material de cultivo celular, Nunc (CABA, Arg.).
- Antibióticos/antimicótico: Estreptomina (1.000 U.I.) y Penicilina G. sódica (3.000.000 U.I.), Laboratorios Richet S.A. (Buenos Aires, Arg.).

III.2.2 Fuente de alginato

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron dos fuentes distintas de alginato. Por un lado, una sal de alginato de sodio (Sigma Aldrich, CAS Number 9005-38-3) al que se denominó Alginato Comercial (AC), y por el otro, se utilizó el alga parda *Undaria pinnatifida* como fuente del polímero. La misma fue provista por JONO[®], una empresa de Puerto Madryn dedicada a la producción de wakame y alimentos relacionados, gracias a la colaboración con el Dr. F.G. Dellatorre del Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura y Pesca (GIDTAP), Facultad Regional Chubut, UTN. Las algas fueron cosechadas de la costa de Puerto Madryn, se secaron conforme con protocolos estándar de producción y se separaron de acuerdo con sus dos componentes principales (Imagen III.2): lámina (AL) y nervadura (AN). Luego, estos fueron molidos hasta obtener partículas de un tamaño de 1mm.

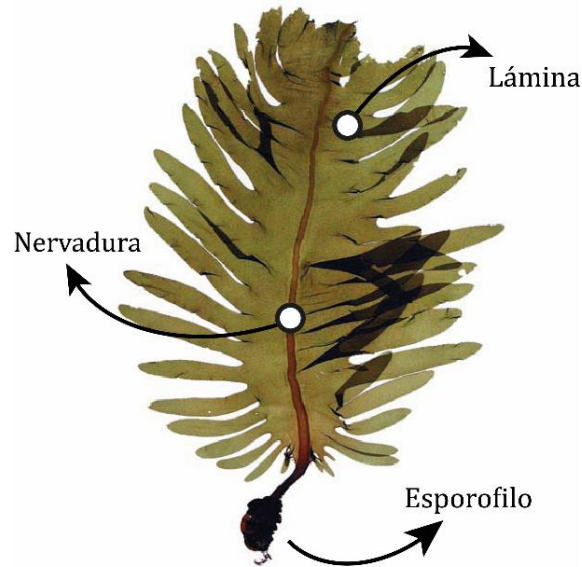


Imagen III.2. Partes características correspondientes a un alga de *Undaria pinnatifida*.
Fotografía adaptada de Te Papa Press, Wellington.

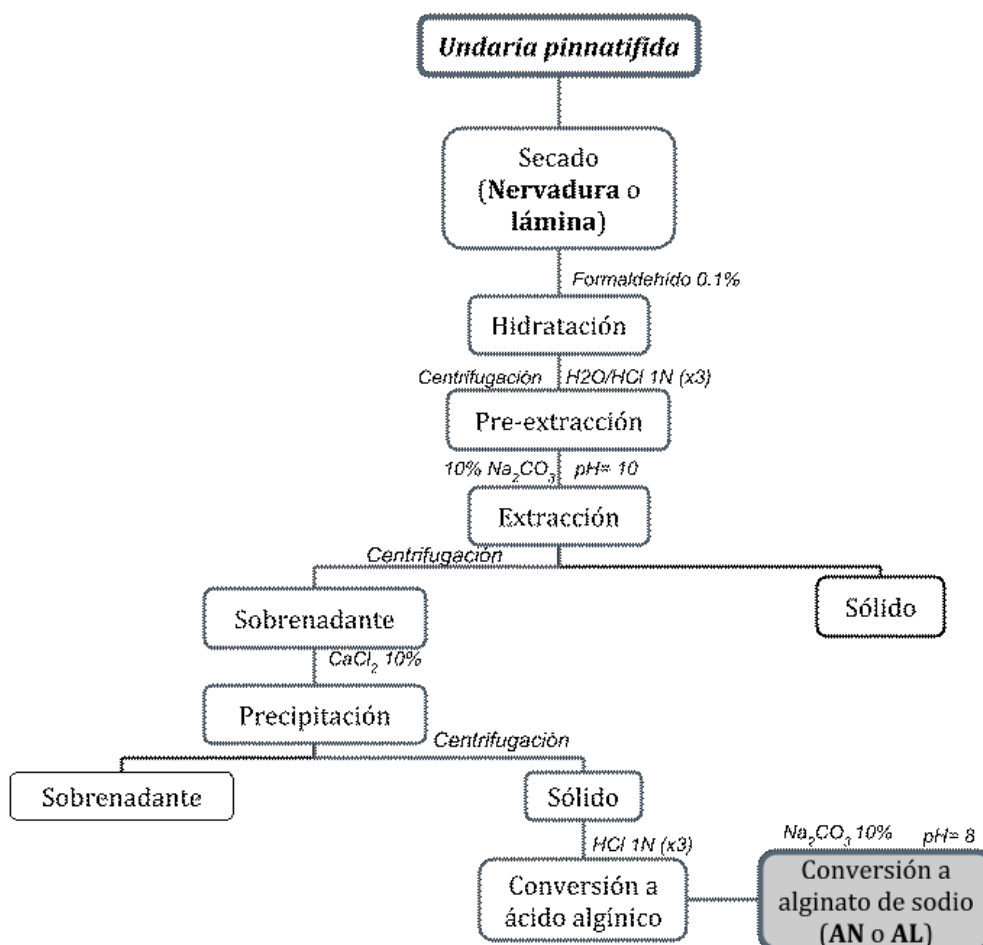
III.2.3 Extracción de alginato

El proceso global de la extracción de alginato a partir de *Undaria pinnatifida* tiene como objetivo la obtención final del mismo en su forma de sal sódica, la forma más estable del polímero, a través de una serie de reacciones de intercambio iónico. Para ello se adaptó un protocolo basado en un estudio previamente publicado [Arvizu Higuera, 1993].

Para obtener este compuesto (Esquema III.1), una parte de la harina de alga recibida ya sea tanto de lámina o nervadura, se hidrató durante la noche con 9 partes de formaldehído 0.1% en agitación constante para eliminar pigmentos y polifenoles. Con el fin de realizar una pre-extracción y convertir el alginato de calcio, tal como se encuentra en el alga, en ácido algínico; al sólido hidratado obtenido se agregaron 20 partes de agua destilada por parte de alga inicial utilizada. Este proceso se realizó bajo agitación constante durante 15 minutos, llevando la solución a pH 4 con HCl 1 N. El sólido fue recuperado por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 3 minutos y la fase acuosa fue descartada. Este proceso fue repetido dos veces.

Luego, para extraer el ácido algínico del alga, es necesario convertirlo en alginato de sodio, la forma soluble del polisacárido. Para ello, al sólido obtenido luego de la centrifugación, se le agregaron 100 partes de agua destilada por parte de sólido. La

mezcla resultante se llevó a pH 10 con una solución de Na_2CO_3 10% (p/v) y finalmente se mantuvo en agitación durante 2 h a 80°C . El alginato de sodio solubilizado fue separado del tejido algáceo por centrifugación. Para recuperar el polímero de la fase acuosa, esta se goteó sobre una solución de CaCl_2 10% (p/v) en agitación constante con el fin de obtener alginato de calcio como precipitado. Luego de esta etapa se obtiene un sólido fibroso que no volverá a solubilizarse pero que puede transformarse en ácido algínico agregando agua destilada a la muestra y llevándola a pH 2 con HCl 1 N. Para ello, la mezcla se mantuvo en agitación durante 15 minutos y luego se recuperó el sólido por centrifugación. El procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, la muestra es convertida en alginato de sodio al colocar las fibras en agitación durante 1 h con etanol a pH 8 logrado con una solución de Na_2CO_3 10%. El material obtenido se recuperó por filtración, se guardó a -4°C durante la noche y luego fue liofilizado a -40°C hasta obtener una muestra de peso constante.

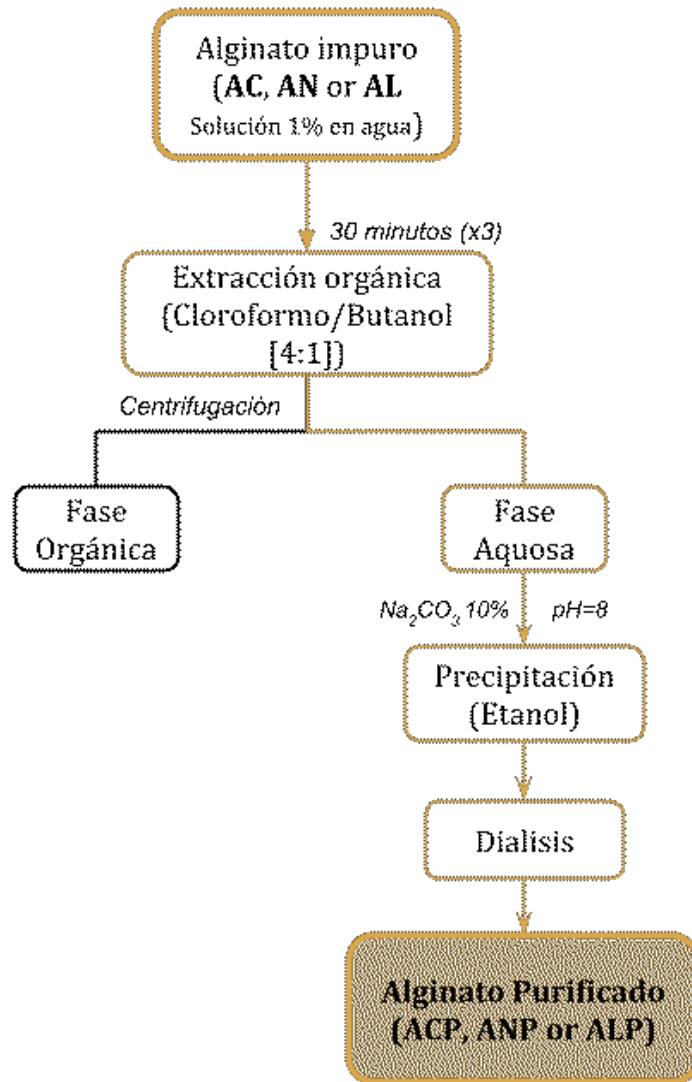


Esquema III.1. Protocolo de extracción de alginato de nervadura (AN) y lámina (AL) del alga *Undaria pinnatifida*.

III.2.4 Purificación de alginato

El protocolo de purificación se realizó tanto para el material recuperado del alga (AN y AL) como el alginato obtenido de manera comercial (AC), y se basó en el Método de Sevag para remoción de proteínas [Qi et al., 2009; Whistler, 1965] (Esquema III.2). Se preparó una solución 1% de alginato en agua destilada, la cual se extrajo con una mezcla de cloroformo/butanol en relación 4:1 en ampolla de decantación. Debido a la formación de emulsión, la mezcla se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 20 minutos y la fracción orgánica fue descartada. Este proceso fue repetido dos veces. Finalmente, el alginato se recuperó precipitándolo en etanol llevado a pH 8 con una solución de Na_2CO_3 10%. Al sólido obtenido se lo dejó bajo campana para favorecer la evaporación del etanol y luego se congeló a -4°C durante la noche para finalmente ser liofilizado a -40°C hasta obtener una masa de peso constante.

Con el fin de eliminar las sales que pudieran quedar del tratamiento final con Na_2CO_3 , se dializó la muestra preparando una solución 1% con el alginato de sodio, que fue introducida a una membrana de celulosa para diálisis (Cut-off: 14.000 Da, Sigma) por 7 días, luego de los cuales la muestra fue nuevamente liofilizada hasta obtener una masa de peso constante.



Esquema III.2. Protocolo de purificación de alginato

III.2.5 Técnicas de caracterización

III.2.5.1 Espectroscopía FTIR

El análisis de los grupos funcionales de las muestras de alginato de sodio (comercial AC, extraídos; AN y AL; y sus derivados purificados: ACP, ANP y ALP) se realizó mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) empleando un equipo Shimadzu IRAffinity-1S entre 4000 y 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 40 scans de acumulación. Para este estudio, se prepararon soluciones acuosas de alginato de sodio al 0.25% (p/v) para obtener films por el método de casting. Este método se basa en la disolución del polímero, seguido del volcado de la solución obtenida en un molde y la posterior evaporación del disolvente. El análisis del espectro se efectuó

mediante el software EZ-OMNIC 7.4.127 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA).

III.2.5.2 Espectroscopía ^1H -RMN

La identificación estructural y composición monomérica de las muestras se realizó utilizando Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN) en un equipo Bruker 500MHz. Siguiendo el protocolo propuesto por Fertah [Fertah et al., 2014], las medidas fueron realizadas en D_2O a 85°C . Los desplazamientos químicos fueron reportados relativos al pico de agua.

III.2.5.3 Análisis termogravimétrico

La estabilidad térmica de los diferentes alginatos se estudió mediante análisis termogravimétrico (TGA) empleando un equipo Q500-TA. Mediante dicha técnica se midió la variación de la masa de las muestras desde temperatura ambiente hasta 800°C a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, en atmósfera de nitrógeno, aplicando un flujo de gas de $90\text{ mL}/\text{min}$.

III.2.5.4 Viscosidad

El peso molecular promedio viscosimétrico (M_v) de las muestras de alginato se evaluó mediante viscosimetría capilar usando NaCl 0.1 M como disolvente. Las medidas se realizaron partiendo de una solución madre, que se mantuvo bajo agitación mecánica durante 24 h a temperatura ambiente, y las diluciones respectivas se prepararon de tal manera que la viscosidad específica (η_{sp}) fuera $0.3 < \eta_{sp} < 0.8$. Se empleó un viscosímetro capilar tipo Ostwald a 20°C y el M_v se estimó de acuerdo con la ecuación de Mark-Houwink

$$[\eta] \left(\frac{\text{ml}}{\text{g}} \right) = K M_v^a \quad \text{Ecuación III.1}$$

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca y K y a son parámetros característicos para cada sistema polímero-disolvente. Los parámetros K y a se tomaron del trabajo de

Stokke y colaboradores, que emplean el mismo sistema polímero-disolvente, y cuyos valores son 4.84×10^{-3} mL/g y 0.97, respectivamente [Stokke et al., 2000].

III.2.5.5 Determinación de polifenoles

La determinación de los fenoles solubles totales se realizó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu [Singleton et al., 1999] basado en la medición del complejo coloreado verde-azul que se obtiene como resultado de la oxidación de los grupos fenólicos con los ácidos fosfomolibdénico y fosfotungsténico presentes en el reactivo Folin-Ciocalteu. Para ello, 100 μ L de una solución 1% de alginato de sodio (AC, AN, AL, ACP, ANP o ALP) se combinaron con 50 μ L de agua destilada y 50 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla se agitó e incubó por 3 minutos, luego de los cuales se agregaron 100 μ L de una solución de Na_2CO_3 al 20%. Finalmente se agregó agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 1500 μ L y se procedió a la incubación de las muestras a temperatura ambiente por 90 minutos para dar paso a la oxidación. Las medidas de absorbancia se realizaron a 760 nm y se utilizó ácido gálico (Sigma-Aldrich) como estándar para obtener una curva de calibración que relacionara la absorbancia obtenida con la concentración de polifenoles solubles. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por g de alginato de sodio.

III.2.5.6 Evaluación de proteínas

La presencia de proteínas remanentes en los extractos de alginato se determinó por electroforesis. Para ello, se sembraron 10 μ L de una solución 1% de alginato sobre tiras de acetato de celulosa y la electroforesis se realizó a corriente constante de 1 mA/cm, utilizando un buffer de migración a pH 8.8 (ácido dietilbarbitúrico 0.075 μ M). El proceso se detuvo luego de 45 minutos y las tiras de acetato de celulosa se colorearon con una solución de Ponceau S (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, el exceso de colorante se retiró empleando una solución 5% de ácido acético. La evaluación de proteínas presentes en las tiras de acetato de celulosa se realizó por visualización en fotografías tomadas con una cámara fotográfica Nikon.

III.2.6 Estudios de biocompatibilidad

Todos los procedimientos utilizados en el presente trabajo de tesis, que implican animales de experimentación, fueron llevados a cabo de acuerdo con la guía de Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio [National Research Council, 2010], bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales - Disposición ANMAT 6677/10 - e internacionales - Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones. Además, los protocolos de experimentación aquí descriptos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata (CICUAL, Protocolo Número 019-06-15).

III.2.6.1 Cultivos celulares

III.2.6.1.1 Células progenitoras de médula ósea (CPMO)

Se obtuvieron células progenitoras de médula ósea (CPMO) de ratas Sprague-Dawley (machos - 3 meses de edad) que fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia. Se disecaron los fémures y luego de un lavado con alcohol 70° se cortaron las epífisis en condiciones de esterilidad a fin de exponer el canal medular por el cual se hizo fluir medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/L) y estreptomycin (100 mg/L) (medio basal). La suspensión obtenida fue recolectada en tubos estériles y se plaqueó en frascos de cultivo celular de 25 cm² manteniéndose en estufa de cultivo a 37°C, en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂ (condiciones basales). Luego de 24 h, las células no adheridas fueron removidas aspirando el medio de cultivo, el cual se renovó tres veces por semana hasta que las células llegaron a confluencia (aproximadamente 10 días). A continuación, la monocapa celular fue despegada de los frascos de cultivo usando 0.025% p/v de tripsina en solución salina de buffer fosfato (PBS 0.01 M, pH 7.4) / EDTA (1 mM) y las células transferidas a frascos para cultivo celular de 75 cm², o a platos de cultivo multipocillos para realizar los diferentes experimentos manteniendo las mismas condiciones de cultivo [Molinuevo et al., 2010].

III.2.6.1.2 Células RAW 264.7 (ATCC TIB-71)

Las línea celular RAW 264.7 deriva de macrófagos murinos (*Mus musculus*) obtenidos a partir de un tumor inducido por la inyección intraperitoneal del virus de leucemia Abelson en ratones macho adultos de la cepa BALB/c. Estas células crecen adhiriéndose a las superficies de cultivo estándares y poseen morfología monocítica [Raschke et al., 1978]. La línea celular expresa distintos marcadores de citotoxicidad tales como síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), expresión de óxido nítrico sintasas (NOS) y, además, poseen capacidad de diferenciarse hacia macrófagos con alta capacidad fagocítica [Denlinger et al., 1996]; por este motivo constituyen un excelente modelo biológico *in vitro* para estudios de citotoxicidad y degradación de distintas sustancias y han sido ampliamente empleadas para tal fin tanto en nuestro laboratorio como por otros investigadores. Las células RAW 264.7 se cultivaron en frascos de cultivo celular de 75 cm² en DMEM suplementado con 5% de SFB, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. Para realizar los subcultivos, las células fueron despegadas del frasco, usando PBS / EDTA (1 mM) y se resuspendieron en DMEM con 5% SFB.

III.2.6.2 Incubaciones

Para realizar las evaluaciones *in vitro*, los distintos tipos celulares fueron cultivados en presencia del polímero. Para ello se prepararon soluciones concentradas de alginato (2%) de las tres fuentes de partida, tanto en su estado puro como impuro, en agua destilada. Las mismas fueron esterilizadas por autoclave durante 15 minutos a 1 atm y 121°C. Al momento de incubar, las soluciones stock fueron diluidas con DMEM para alcanzar una concentración final de 0.02%.

III.2.6.3 Viabilidad Celular

Para estudiar la viabilidad celular en presencia de las distintas muestras de alginato, se realizaron ensayos de proliferación usando RAW 264.7 o CPMO. Esto se evaluó mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). El MTT, compuesto amarillo soluble en agua, en células viables se reduce

metabólicamente por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa a formazán azul-violeta insoluble. La actividad mitocondrial de las células tratadas se correlaciona con la intensidad de color determinada por mediciones espectrofotométricas después de disolver el formazán en dimetilsulfóxido (DMSO) y es directamente proporcional al número de células viables [Grillo et al., 2010]. Este ensayo se llevó a cabo cultivando 3×10^5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos a 37°C en 5% de CO₂ en atmósfera húmeda con medio basal durante 24 h, para permitir la adhesión celular. Luego de este período de incubación, el medio de cultivo fue reemplazado por las soluciones de alginato diluidas en DMEM sin SFB, o el mismo en ausencia del polímero (condición control), y se procedió a cultivar durante 48 h adicionales. Posteriormente, se retiró el medio y se reemplazó por 1 mL de DMEM conteniendo MTT (0.1 mg/mL) para lo cual se incubaron las células durante 1 h. Finalmente, se descartó el medio de cultivo y se adicionaron 100 µL de DMSO a cada pocillo para la lisis celular y la disolución del formazán, agitando durante 10 min. A continuación, el extracto se transfirió a otra placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector automático de placa de ELISA (Infinite® F50, Tecan Trading AG, Switzerland). Los datos para este ensayo fueron expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal la cantidad de células adheridas en la superficie control luego de finalizado el ensayo.

III.2.6.4 Evaluación de la capacidad osteogénica

Para estos estudios las células CPMO fueron plaqueadas en platos de 24 pocillos con una densidad de 5×10^4 células por pocillo en medio basal e incubadas a 37°C en 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Con el fin de inducir la diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico, una vez alcanzado el 80-90% de confluencia celular, el medio basal se suplementó con 25 mg/ml de ácido ascórbico y 5 mM de β-glicerofosfato de sodio (medio osteogénico), renovando el mismo 3 veces por semana. Este medio osteogénico se utilizó como disolvente para la dilución de las soluciones de alginato stock previamente esterilizadas en autoclave por 15 minutos a 1 atm y 121°C. El β-glicerolfosfato actúa como fuente de fosfato de la fosfatasa alcalina para producir los depósitos de mineral y funciona de forma complementaria con el ácido ascórbico, un

cofactor necesario en la síntesis de colágeno, para promover la expresión del fenotipo osteoblástico [Quarles et al., 1992].

La capacidad osteogénica de las células CPMO creciendo en presencia de los alginatos se evaluó a través de la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) y la producción de colágeno tipo I (Colt1) mediante métodos colorimétricos. Todos los datos fueron expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal las células que crecieron en ausencia de alginato.

III.2.6.4.1 Actividad de fosfatasa alcalina (FAL)

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL), un marcador del fenotipo osteoblástico, se evaluó sobre extractos de las células CPMO diferenciadas en presencia o ausencia de alginato durante 15 días en medio osteogénico. Al final de este período de incubación se descartó el medio de cultivo, se lavó con PBS y se lisaron las células con 300 μ L Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Arg.) 0.1% v/v en agua destilada. Una alícuota del extracto celular obtenido fue utilizada para evaluar la actividad de la FAL por el método colorimétrico cinético utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma- Aldrich, Buenos Aires, Arg.). El producto de hidrólisis, p-nitrofenol, se determinó por absorbancia a 405 nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37°C en buffer glicina (glicina 55 mM, MgCl₂ 0.55 mM, pH=10.5) durante un período de tiempo determinado [Fernández et al., 2014]. Por otro lado, otra alícuota del extracto se utilizó para determinar la concentración de proteínas celulares totales por el método colorimétrico de Bradford, determinando la absorbancia a 595 nm (PG Instruments T60 UV/VIS Spectrophotometer). [Bradford, 1976].

III.2.6.4.2 Producción de colágeno tipo 1

La producción de colágeno tipo 1 (Colt1) se determinó utilizando un ensayo colorimétrico mediante la técnica de Sirius Red [Tullberg-Reinert & Jundt, 1999]. Luego de 15 días de diferenciación osteoblástica, las células se fijaron con solución fijadora de Bouin (ácido pícrico saturado / formaldehído 35% / ácido acético glacial, 15:5:1) durante 1 h. Luego se lavó con ácido clorhídrico 0.1 N y se tiñó con una solución del colorante Sirius Red (Sigma-Aldrich Buenos Aires, Arg.) (0.1% p/v en ácido pícrico saturado) por 1

h. Trascurrido este período de tiempo se retiró el exceso del colorante, se extrajo con NaOH 0.1 N y se midió la absorbancia a 550 nm. En paralelo se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de colágeno comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

III.2.6.5 Evaluación de citotoxicidad

III.2.6.5.1 Producción de NO

El óxido nítrico (NO) es un efector de la respuesta inmune innata de los macrófagos como consecuencia a la presencia de diversos patógenos, producido por la enzima NO sintasa inducible (iNOS) [Lowenstein & Padalko, 2004]. Para evaluar la eventual citotoxicidad de los alginatos mediante la liberación de NO hacia el medio de cultivo por RAW 264.7, se empleó el método de Griess [Fernández et al., 2014]. Para ello, se cultivaron 3×10^5 células por pocillo en una placa de 24 a 37°C en 5% de CO₂ en atmósfera húmeda con medio basal durante 24 h para permitir la adhesión celular. Luego, el medio de cultivo fue reemplazado por las soluciones de alginato diluidas en DMEM-5% SFB sin rojo de fenol y se cultivó durante 48 h. El método utiliza como agente de diazotación ácido sulfanílico (1% p/v en ácido fosfórico al 5%, Reactivo A) y como agente de acoplamiento el N-1-naftilendiamina (0.1 % p /v en agua destilada, Reactivo B). La reacción se lleva a cabo mezclando volúmenes iguales de reactivo A y reactivo B; luego esta mezcla se adiciona en relación 1:1 al medio condicionado y se mide la absorbancia a 550 nm. Se realizó en paralelo una curva de calibración para los reactivos de Griess utilizando como patrón nitrito de sodio a concentraciones entre 0-100 nM (NaNO₂, Biopack, Bs. As., Argentina). También se incluyeron células tratadas con lipopolisacárido (LPS, 1 µg/mL) como control positivo y células sin tratamiento como control negativo de la producción de NO.

Con el objetivo de observar cambios morfológicos, las células RAW 264.7 fueron expuestas a los diferentes alginatos de la manera antes descrita. Luego de 48 h de cultivo, la monocapa de macrófagos se lavó con PBS y se fijó con metanol durante 5 minutos para su posterior tinción con Giemsa. Finalmente, se observaron las células utilizando un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100.

III.2.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y, a menos que se indique lo contrario, se obtuvieron a partir de al menos dos experimentos separados realizados por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey con el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ para todos los análisis estadísticos.

III.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1 Extracción de alginato de sodio

La selección del protocolo de extracción de alginato a partir de *Undaria pinnatifida* se realizó en base a una exhaustiva búsqueda bibliográfica en la que se compararon los rendimientos de obtención del polímero, las metodologías y materiales empleados. El polisacárido se extrajo hasta obtener su sal sódica ya que se ha demostrado que la misma es la forma más estable y con mejor solubilidad en agua [Haug et al., 1967].



Imagen III.3. Harina de *Undaria pinnatifida* de A) Nervadura y B) Lámina.

En la Imagen III.4 se puede observar el producto de la obtención de alginato a partir de *Undaria pinnatifida*, alcanzando un 12% y 17% (g alginato de sodio/ g de alga) de rendimiento de la extracción global para la muestra proveniente de lámina (AL) y nervadura (AN) respectivamente, realizando este proceso por lo menos siete veces para cada una de ellas a lo largo del transcurso de este trabajo de tesis. Estos valores resultaron ser menores a los publicados por Arvizu Higuera [Arvizu Higuera, 1993] (alrededor de 28%). Sin embargo, esta diferencia podría deberse a que la especie utilizada por ellos fue *Macrocystis pyrifera*. Por otro lado, al comparar con autores que también utilizaron *Undaria pinnatifida* para la obtención de alginato, observamos que el rendimiento de extracción fue similar al de Apoya y colaboradores [Apoya et al., 2002], sin embargo, no resultó comparable con trabajos como los de Skriptsova et al. quienes obtuvieron un rendimiento de alrededor del 27% en nervadura y de entre 34-

51% en lámina, dependiendo de la estación de cosecha [Skriptsova et al., 2004]. La diferencia podría estar atribuida a que estos autores utilizaron otro tipo de protocolo de extracción, pero también a que los factores implicados en la regulación del rendimiento, así como de la composición monomérica del alginato, depende tanto de la especie como de los cambios estacionales y el estado de desarrollo al momento de la cosecha del alga [Indergaard et al., 1990].

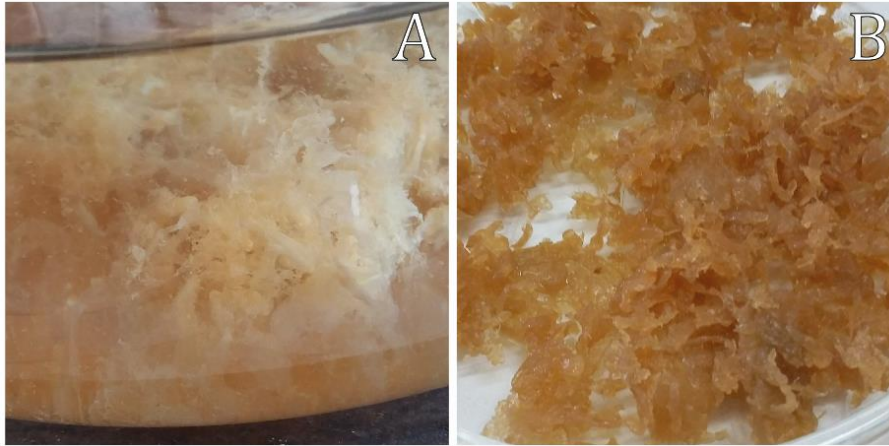


Imagen III.4. A) Fibras de alginato de sodio en alcohol. B) Fibras de alginato de sodio filtradas.

III.3.2 Purificación de alginato de sodio

Para eliminar o reducir las posibles impurezas del alginato se decidió utilizar el Método de Sevag [Whistler, 1965] para desproteización de polisacáridos, un protocolo sencillo, rápido y que se puede llevar a cabo con materiales accesibles. El rendimiento de purificación fue de 68%, 55% y 45% para AC, AN y AL respectivamente, calculando como g alginato de sodio/g alginato de sodio impuro (Tabla III.1).

Muestra	g AlgNa impuro/g alga	g AlgNa puro/ g AlgNa impuro	g AlgNa puro/g alga
AN	0.17	0.55	0.094
AL	0.12	0.45	0.054

Tabla III.1. Rendimiento de la extracción y purificación del alginato de sodio (AlgNa) proveniente de *Undaria pinnatifida*.

III.3.3 Caracterización del alginato de sodio

III.3.3.1 Espectroscopia FTIR

La conservación de la estructura del polímero luego de la extracción (AN y AL) así como del proceso de purificación para todas las muestras (ACP, ANP y ALP) se estudió mediante análisis espectroscópico FTIR por comparación con la muestra de alginato de sodio comercial (AC) y por asignación de las diferentes señales de acuerdo con Rao [Rao et al., 2013], tal como se muestra en la Figura III.1. En el espectro, en todos los casos, se observan las bandas características correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H en el rango 3379-3400 cm^{-1} , las vibraciones de estiramiento del enlace alifático C-H en 2927-2937 cm^{-1} , y a las vibraciones simétricas y asimétricas de estiramiento de aniones carboxilatos (COO^-) en las bandas 1412-1417 cm^{-1} , 1080-1093 cm^{-1} y 1033-1037 cm^{-1} . La aparición de todas las bandas asignadas a los grupos funcionales característicos del polisacárido estudiado evidencia una extracción exitosa, así como también la conservación de la estructura del polímero luego del proceso de purificación.

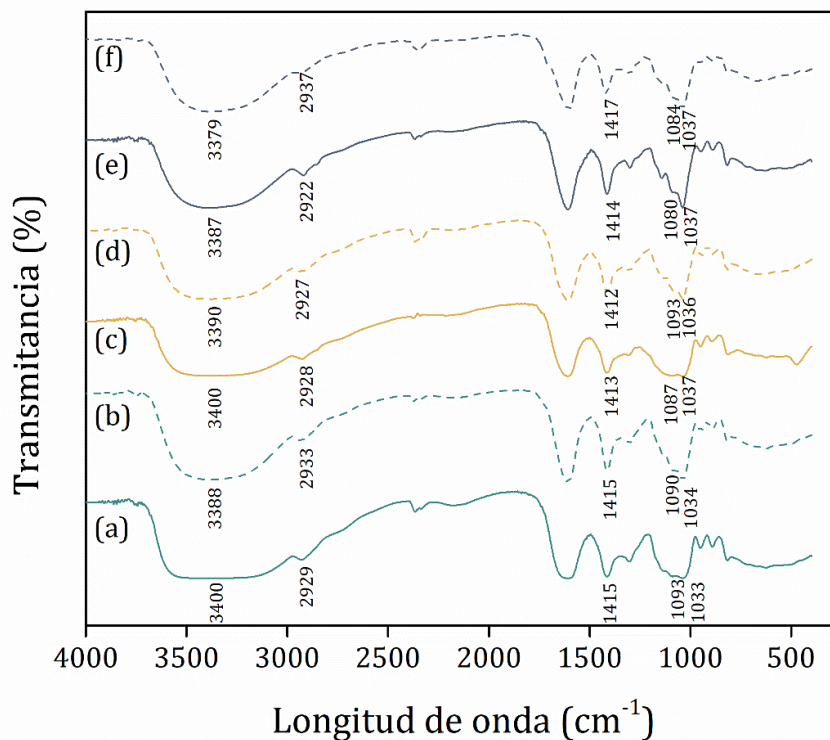


Figura III.1. Espectro FTIR de las muestras de alginato de sodio: (a) AC, (b) ACP, (c) AN, (d) ANP, (e) AL y (f) ALP.

III.3.3.2 Espectroscopía ¹H-RMN

La espectroscopía ¹H-RMN es considerada como el método más confiable para dilucidar la composición estructural del alginato, así como también composición y la distribución de sus monómeros (G y M) en copolímeros en bloque. La estructura de los monómeros y la asignación de la señal de los picos se presentan en la Tabla III.2. Además, en la Figura III.2, se observan los espectros obtenidos por ¹H-RMN para todas las muestras de alginato.

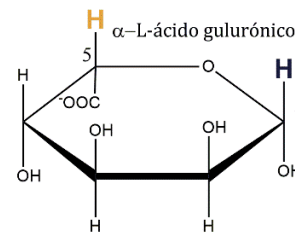
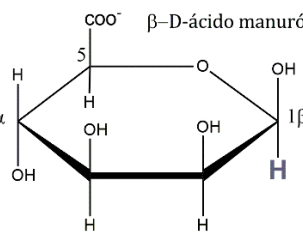
Estructura monómeros	δ (ppm)	Integración	Asignación
 α -L-ácido gularónico	5.03	1 α	I _{AAG}
 β -D-ácido manurónico	4.64	5H	I _{AG}
	4.41	1 β	I _{AAM}

Tabla III.2 Asignación de señales del espectro ¹H-RMN (D₂O) del alginato.

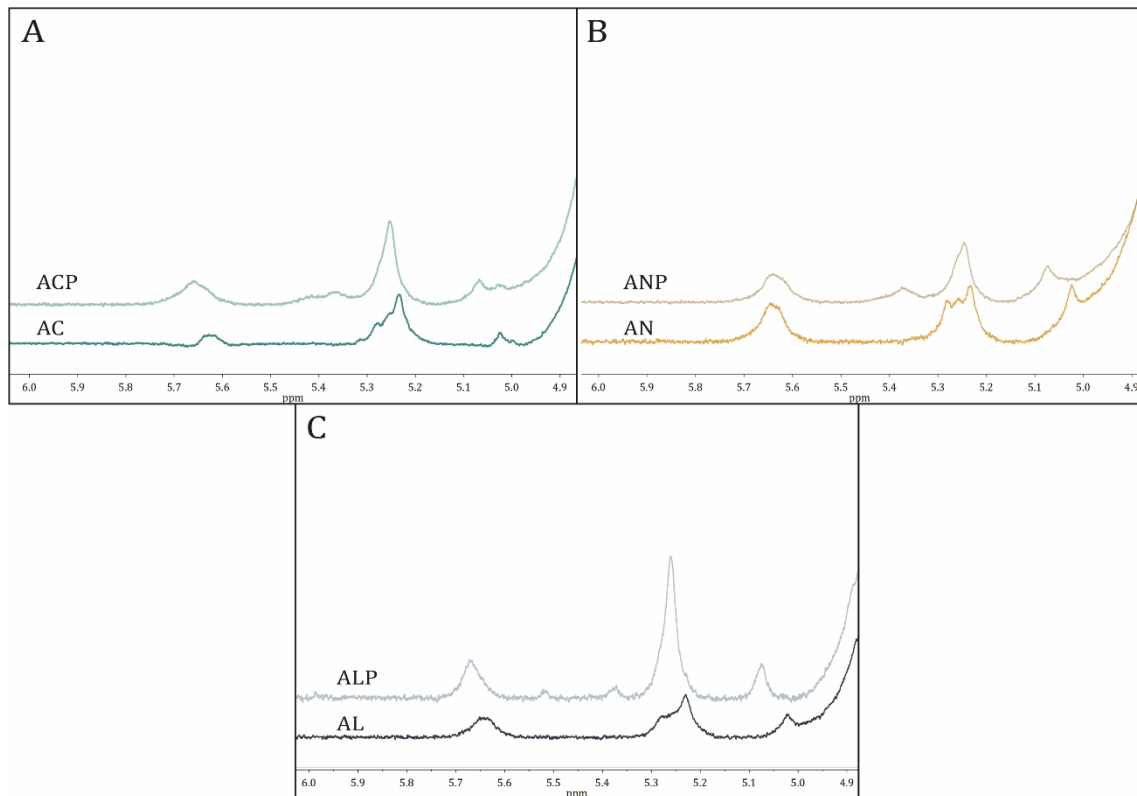


Figura III.2. Espectros de ¹H-RMN de A) AC-ACP, B) AN-ANP y C) AL-ALP.

El método propuesto por Grasdalen y colaboradores [Grasdalen et al., 1979; Grasdalen, 1983] hace posible calcular la relación M/G, en donde las señales y las áreas relativas de los protones anoméricos pueden ser utilizados para el análisis cuantitativo de la fracción molar de ácido gulurónico (F_G).

La integral de cada señal (I) puede ser utilizada para calcular F_G mediante la siguiente ecuación:

$$F_G = \frac{I_{AAG}}{(I_{AAM} + I_{AG})} \quad \text{Ecuación III.2}$$

La fracción M (F_M) es deducida por:

$$F_M = 1 - F_G \quad \text{Ecuación III.3}$$

Y la relación M/G es calculado por:

$$M/G = \frac{(1 - F_G)}{F_G} \quad \text{Ecuación III.4}$$

De esta manera, la fracción molar de cada monómero y la relación M/G en el alginato corresponde a la integración del protón anomérico del ácido gulurónico (I_{AAG}), del protón anomérico del ácido manurónico (I_{AAM}) y del protón 5H del ácido gulurónico (I_{AG}). Sobre la base de este análisis, puede observarse en la Tabla III.3 que todas las muestras presentaron cantidades similares de ambos monómeros en su estructura pero que la relación M/G fue modificada de manera apreciable luego de la purificación, con un aumento en la composición del monómero M.

Varios estudios han abierto el debate sobre el efecto que puede tener la relación M/G en la biocompatibilidad del alginato. Uno de estos plantea que los bloques M son los responsables de la estimulación de monocitos para producir citoquinas [Otterlei et al., 1991; Espevik et al., 1993] y la inducción de una respuesta mediada por anticuerpos [Kulseng et al., 1999]. Al evaluar el efecto de la composición monomérica del alginato sobre la biocompatibilidad de microperlas entrecruzadas con cationes divalentes, algunos autores observaron que aquellas con un mayor contenido de M presentaron un aumento en la capacidad inmunogénica con respecto a los materiales desarrollados con

alginato rico en G [Duvivier-Kali et al., 2001; Kulseng et al., 1999]. A su vez, otros autores observaron un efecto opuesto, en donde la mayor proporción de M resultó en un aumento en la biocompatibilidad [Tam et al., 2011; De Vos et al., 1997]. Sin embargo, otros autores observaron que la inyección o implante de alginatos purificados ricos en M no presentó respuesta inmunogénica o no mostró una diferencia significativa con el polisacárido con mayor proporción en G [Omer et al., 2005; Orive et al., 2002; Lee & Lee, 2009]. Debido a estos resultados, es probable que la respuesta inmunogénica puede ser atribuida a las impurezas presentes en el polisacárido y que, mientras el alginato sea purificado, este puede ser biocompatible independientemente del contenido M/G

El análisis de $^1\text{H-NMR}$ también mostró que el proceso de purificación generó un ligero cambio en la composición del polímero debido a la desaparición de bandas características de bloques compuestos por M y G (Figura III.2). Estos resultados sugieren que durante la secuencia de pasos de purificación se producen cambios en la estructura respecto a la conformación de los bloques del polisacárido. Un análisis más detallado y profundo de esta modificación en la composición monomérica de la muestra luego de la purificación podría ser motivo de trabajos futuros.

<i>Muestra</i>	F_G	F_M	M/G
AC	0.50	0.50	1.00
ACP	0.43	0.57	1.32
AN	0.50	0.50	1.00
ANP	0.45	0.55	1.22
AL	0.55	0.45	0.82
ALP	0.41	0.59	1.44

Tabla III.3. Fracción molar de los monómeros (G y M) y composición M/G del alginato.

III.3.3.3 Análisis termogravimétrico

La estabilidad térmica de los diferentes alginatos fue estudiada mediante un Análisis Termogravimétrico (TGA) en atmósfera inerte (flujo de nitrógeno). En la Figura III.3 se muestran las curvas de pérdida de masa de las muestras, cada una acompañada

de su correspondiente derivada (DTG) y en la Tabla III.4 se presenta la información relevante de la descomposición térmica calculada desde los gráficos.

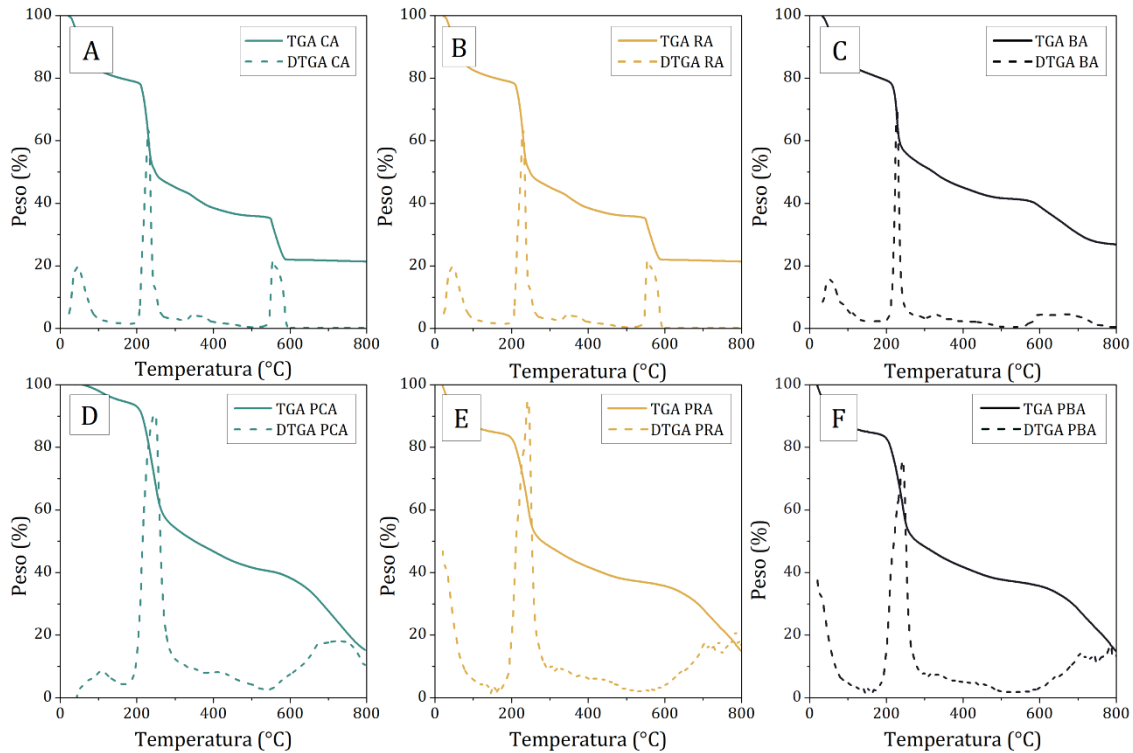


Figura III.3. Estabilidad térmica de AC (A), AN (B), AL (C), ACP (D), ANP (E) y ALP (F).

Muestra	TDI (°C)	Tmax ₁ (°C)	PM _{Tmax1} (%)	Tmax ₂ (°C)	PM _{Tmax2} (%)	Residuo (%) 800°C
AC	207.5	230.2	40.0	560.7	71.8	20
ACP	205.6	246.1	29.1	718.5	75.1	15
AN	209.8	228.0	31.9	653.7	65.9	27
ANP	201.8	243.7	38.5	748.9	77.0	14
AL	204.5	235.5	29.6	697.6	59.1	34
ALP	203.8	242.8	33.8	702.8	77.8	12

Tabla III.4. Datos de TGA de AC, ACP, AN, ANP, AL y ALP.

Antes de los 150°C puede observarse pérdida de masa en las curvas que resulta de la deshidratación de las muestras, dada por la presencia de humedad o agua coordinada en las mismas. Luego, se observaron dos etapas de descomposición muy

marcadas: la primera entre 200°C a 600°C y la segunda a partir de 600°C. De acuerdo con observaciones de otros autores, estas etapas de descomposición corresponden a la formación y posterior degradación de Na_2CO_3 [Liu et al., 2016; Soares et al., 2004]. Las temperaturas de descomposición inicial (TDI) fueron similares y cercanas a 200°C para todas las muestras de alginato de sodio estudiadas, independientemente de su origen o estado de purificación. T_{max_1} y T_{max_2} son las temperaturas de descomposición máxima para cada etapa. Mientras que T_{max_1} no cambió con el proceso de purificación, T_{max_2} muestra una variación hacia temperaturas mayores que representa un aumento en la pérdida de masa (PM). Consistentemente, se observó una disminución en la cantidad de residuo luego de la purificación. De esta forma, las temperaturas de descomposición inicial del alginato no se vieron afectadas por el proceso de purificación. Además, el bajo porcentaje de masa final conseguido en el análisis termogravimétrico indica una disminución del contenido de sal y sugiere, globalmente, una disminución de las impurezas en la muestra (Tabla III.4).

III.3.3.4 Viscosidad

La viscosimetría de soluciones diluidas es útil para obtener información relacionada con las interacciones polímero-solvente y con el tamaño y la forma de las moléculas de polímero en solución. Para ello se la relaciona con la habilidad intrínseca de un polímero de incrementar la viscosidad de un disolvente a una temperatura determinada. En la Tabla III.5 se muestra el peso molecular promedio viscosimétrico (M_v) evaluado para cada muestra a partir de un viscosímetro capilar del tipo Ostwald. La viscosidad intrínseca ($[\eta]$) se considera la magnitud más apropiada para determinar pesos moleculares de polímeros, ya que es la que se encuentra directamente relacionada con el tamaño molecular. La misma fue calculada por la doble extrapolación de las ecuaciones de Huggins y Kramer:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2c \quad \text{Ecuación III.5}$$

$$\frac{\ln \eta_{red}}{c} = [\eta] + k_K[\eta]^2c \quad \text{Ecuación III.6}$$

Donde η_r es la viscosidad relativa, η_{sp} es la viscosidad específica y k_H y k_K son los coeficientes de Huggins y Kramer, respectivamente. $[\eta]$ fue estimada como el promedio de la intersección de las ordenadas al origen de las dos extrapolaciones (Figura III.4). Entonces, el peso molecular promedio viscosimétrico fue calculado utilizando la ecuación de Mark-Huggins mencionada anteriormente en la sección III.2.5.4.

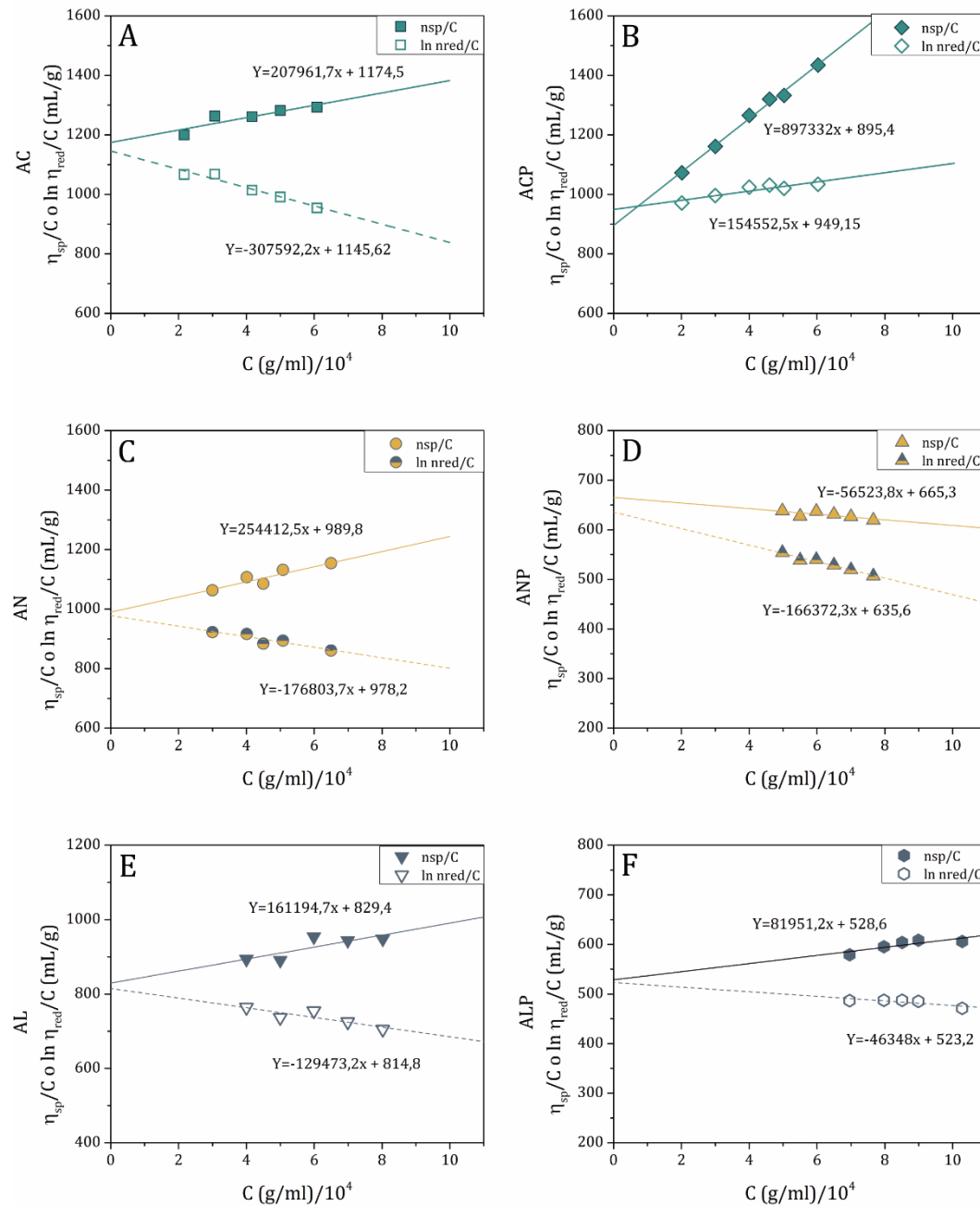


Figura III.4. Extrapolaciones de viscosidad η_{sp}/C o $\ln \eta_{red}/C$ vs C (g/ml)/ 10^4 de AC, AN, AL, ACP, ANP y ALP.

	AC	ACP	AN	ANP	AL	ALP
$[\eta]$ (mL/g)	1162.4	960.36	982.86	623.21	821.2	525.1
M_v (g/mol $\times 10^5$)	3.5	2.9	2.9	1.8	2.4	1.5

Tabla III.5. Peso molecular promedio viscosimétrico de las muestras de alginato en NaCl 0.1 M.

En la Tabla III.5, puede observarse que el peso molecular viscosimétrico (M_v) del alginato de sodio extraído de alga fue inferior al del polisacárido obtenido de forma comercial. Por otro lado, todas las muestras presentaron una reducción en su peso molecular luego del proceso de purificación con respecto al material crudo. Este comportamiento refleja la susceptibilidad del alginato a los cambios de pH en su entorno, lo que podría provocar la hidrólisis parcial de cadenas del polímero y, por lo tanto, la disminución en su peso molecular viscosimétrico. Sin embargo, parece existir una tendencia consistente con respecto al efecto producido por la purificación en el alginato obtenido tanto de manera comercial como extraído a partir de algas. Dusseault y colaboradores [Dusseault et al., 2006] observaron un aumento en la viscosidad de las soluciones de alginato de origen comercial luego de un proceso de purificación y, por lo tanto, a un aumento en el peso molecular viscosimétrico. Estos autores sugieren que ese efecto puede estar dado por la pérdida de cadenas cortas del alginato o por la eliminación de contaminantes que, de alguna manera, podrían haber interferido en las interacciones débiles y la organización tridimensional del polímero. A su vez, Gomez [Gomez et al., 2009] comparó tres protocolos de purificación de alginato obtenido a partir de *Macrocystis pyrifera* y obtuvo resultados dispares, por lo que sugirió que el grado de degradación de las cadenas del polímero podría estar sujeto a la cantidad de pasos requeridos por el proceso de purificación y la duración del mismo. Prokop y Wang [Prokop & Wang, 1997] llegaron a conclusiones similares, observando una disminución de la viscosidad intrínseca de un 10-30% en soluciones de distintos alginatos de origen comercial. Estos reportes sugieren, por lo tanto, que el producto final de la purificación de alginato depende no solo de la fuente del polisacárido utilizada, sino también de las condiciones experimentales utilizadas para purificarlo.

III.3.3.5 Determinación de polifenoles

Las impurezas más comunes presentes en el alginato, independientemente de su origen, son polifenoles y proteínas [Pedersen et al., 1984], cuya presencia en dispositivos biomédicos puede generar una respuesta inmune que reduzca la biocompatibilidad del alginato y, por lo tanto, limitar el uso de este polímero en Ingeniería de Tejido (IT).

Al evaluar el contenido de polifenoles en las muestras de alginato (Figura III.5), se observó que luego del proceso de purificación la concentración de estos disminuyó aproximadamente un 60% en AN y AL ($p < 0.05$). Aunque el protocolo de extracción contempla pasos específicos que buscan aumentar la pureza del producto final, tal como es la etapa de pre-extracción con formaldehído para la eliminación de polifenoles, con estos resultados queda en evidencia que es necesario un procedimiento de purificación posterior para obtener un material con menor cantidad de contaminantes. Por otro lado, en las muestras de alginato comercial sin purificar, no se visibilizó la presencia de polifenoles dentro de los límites de detección de la técnica. Esto podría deberse a que las preparaciones de alginato comercial involucran procesos de blanqueamiento y fijaciones con formaldehído mucho más agresivas a la utilizada en este trabajo, con el fin principal de reducir la pigmentación y contenido de polifenoles, así como la de prevenir la descomposición del producto [Zimmermann et al., 1992; De Vos et al. 1997].

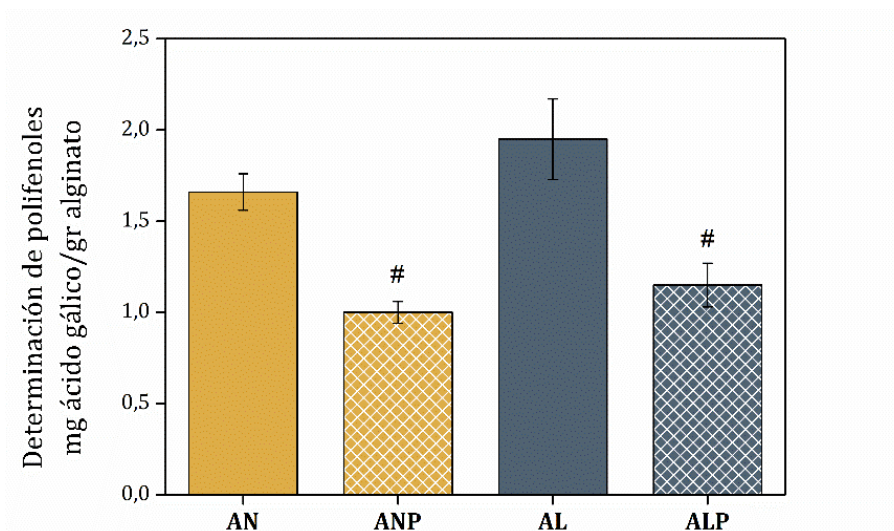


Figura III.5. Determinación de polifenoles en AN, ANP, AL y ALP. #: $p < 0.05$ vs alginato purificado.

III.3.3.6 Evaluación de proteínas

Como se ha mencionado en la sección anterior, las proteínas son una de las principales impurezas presentes en el alginato. Sin embargo, debido a las interferencias provocadas por el polímero en las distintas evaluaciones, su detección representó una ardua tarea.

El método de Bradford para cuantificación de proteínas es un protocolo ampliamente utilizado en nuestro laboratorio y que ha resultado de utilidad para otros autores [Jork et al., 2000; Qi et al., 2009] para evaluar el contenido proteico en el alginato. Sin embargo, a pesar de evaluar un amplio rango de concentraciones de soluciones de alginato, en todos los casos estudiados observamos la interacción del polímero debido a la presencia de metanol en el reactivo en cuestión y formación de un sólido en suspensión de coloración azul muy intensa. Además, los métodos de Biuret y Lowry fueron descartados debido a la presencia de cationes divalentes de cobre (Cu^{+2}), con los cuales el alginato es capaz de entrecruzarse iónicamente y producir un hidrogel. Métodos como el SDS-Page y la espectroscopía UV tampoco han resultado compatibles con la detección de proteínas en nuestras muestras.

Por este motivo, se optó por la utilización de una electroforesis en tiras de acetato de celulosa como método de detección de presencia o ausencia de proteínas en

las distintas fuentes de alginato. En la Figura III.6 pueden observarse grandes cantidades de impurezas proteicas en AC, AN y AL; las cuales no fueron detectadas luego del proceso de purificación. A pesar de las limitaciones de este método, dado que se trata de un método semicuantitativo, los resultados presentados demuestran que un simple paso de purificación puede ser más que suficiente y, además, determinante al momento de obtener un material con menor cantidad de contaminantes.

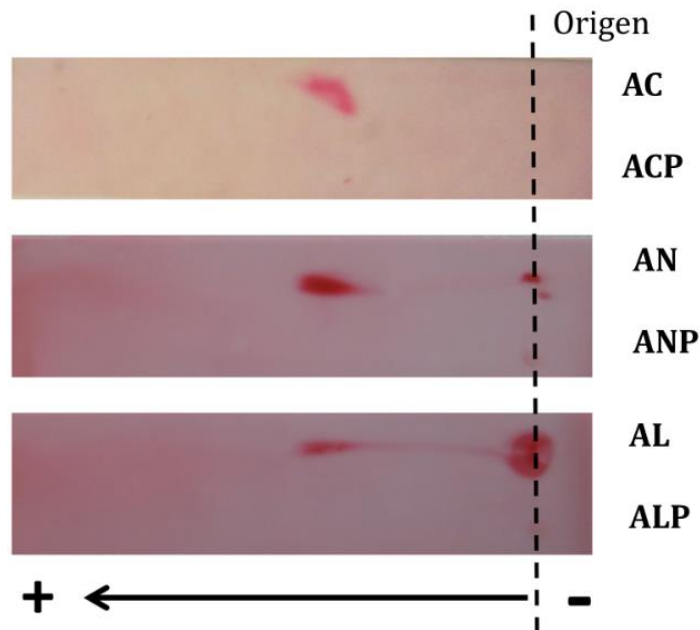


Figura III.6. Determinación semicuantitativa de proteínas en AC, ACP, AN, ANP, AL y ALP por electroforesis en tiras de acetato de celulosa.

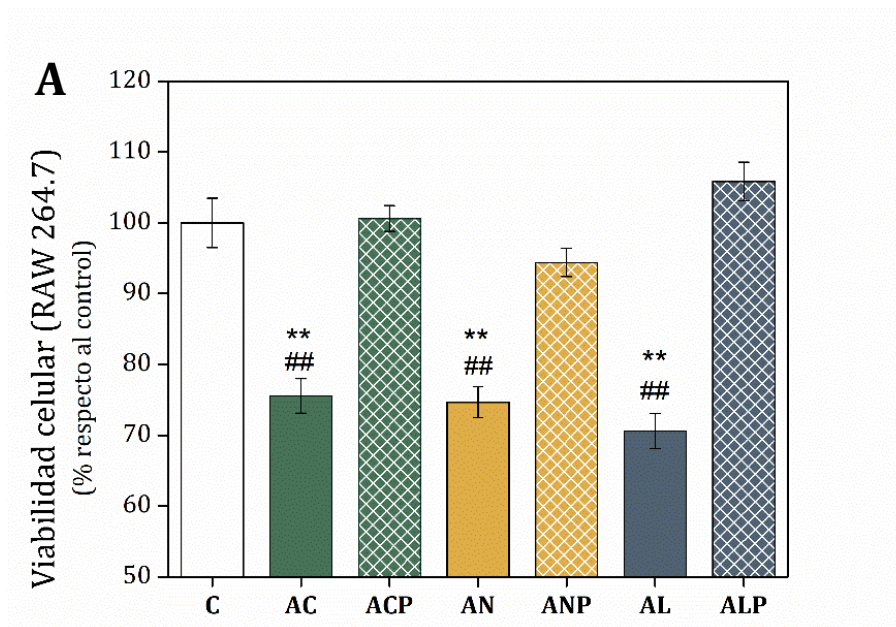
III.3.4 Estudios de biocompatibilidad

Para observar y analizar las interacciones e influencias de los materiales en el comportamiento celular, tanto en su biocompatibilidad como citotoxicidad, es necesario evaluar la respuesta biológica mediante el empleo de células en cultivo. El éxito de un implante *in vivo* está determinado en gran medida por la interacción de los tejidos con un material, por lo que la utilización de cultivos celulares resulta un entorno relativamente sencillo y controlado que permite predecir el efecto del mismo sobre su entorno y rediseñarlo en caso de ser necesario.

III.3.4.1 Viabilidad celular

Para evaluar el efecto del proceso de purificación en la viabilidad celular se estudió el crecimiento de las células RAW 264.7 y CPMO luego de 48 h de cultivo en presencia de todas las muestras de alginato (Figura III.7).

Como se observa en la Figura III.7A, el crecimiento de las células RAW 264.7 se ve disminuido en presencia de las muestras de alginato impuro (AC, AN y AL) respecto tanto a las células creciendo en ausencia de polímero (condición control, $p < 0.01$) como de las muestras purificadas (ACP, ANP y ALP), en donde el efecto negativo sobre la viabilidad celular se vio prevenido ($p < 0.01$).



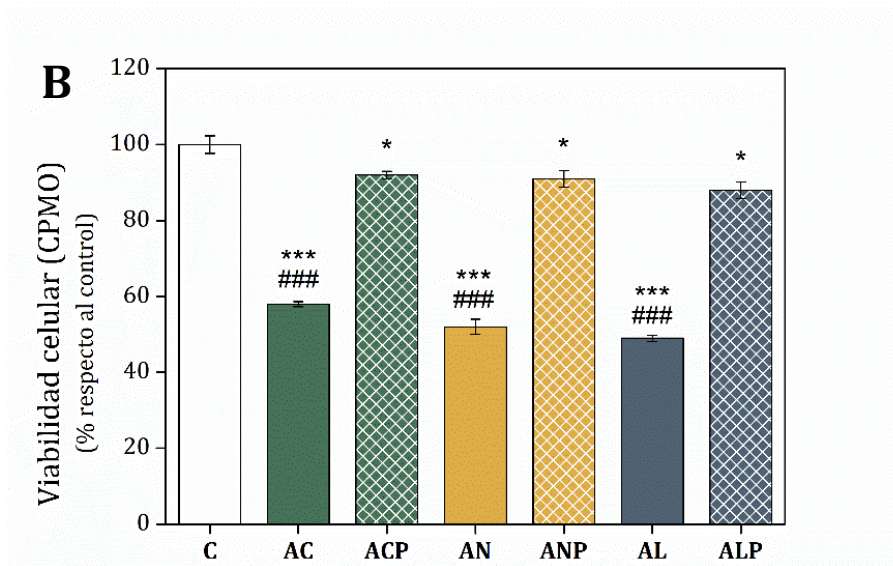


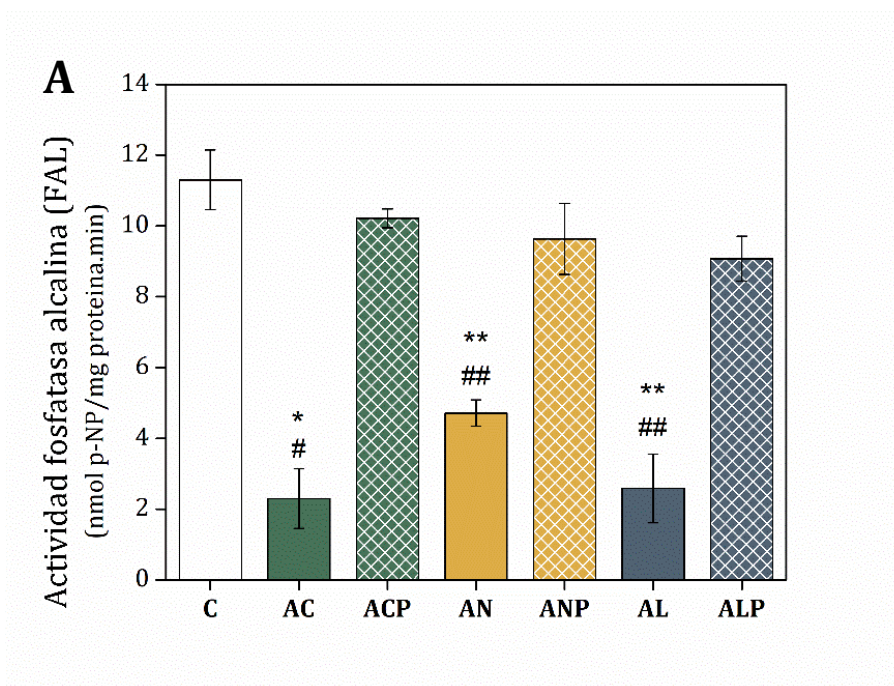
Figura III.7. Viabilidad celular en A) RAW 264.7 y B) CPMO luego de 48 h de incubación con las muestras de alginato de sodio purificadas (ACP, ANP y ALP) e impurificadas (AC, AN y AL). *: $p < 0.05$ vs control (C); **: $p < 0.01$ vs. C; ***: $p < 0.001$ vs. C; #: $p < 0.01$ vs. alginato purificado; ###: $p < 0.001$ vs. alginato purificado.

Por su parte, el cultivo de CPMO (Figura III.7B) también presentó una disminución considerable en la viabilidad cuando las células fueron incubadas en presencia de AC, AN y AL ($p < 0.001$ respecto al control). Algunos autores han reportado una disminución en la viabilidad de células relacionadas al fenotipo osteoblástico al utilizar alginatos comerciales sin ningún tipo de tratamiento de purificación [Wang et al., 2003; Valente et al., 2012; Furuya et al., 2017], lo que sugiere nuevamente que las impurezas presentes en las muestras podrían ser las responsables de un efecto tóxico. Por otro lado, aunque luego de la purificación del alginato la viabilidad celular no alcanzó el mismo nivel de la condición control (disminución del 10%, $p < 0.05$), este efecto se vio considerablemente mejorado en comparación con la viabilidad celular obtenida en presencia de los alginatos crudos ($p < 0.001$).

III.3.4.2 Evaluación de la capacidad osteogénica

Debido a que el alginato formará parte de *scaffolds* para ser utilizados en regeneración ósea, se evaluó la actividad osteogénica de CPMO crecidas con los alginatos en el medio de cultivo. Esta capacidad fue evaluada midiendo la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) y la producción de colágeno tipo I (Colt1) luego de incubar las células CPMO 14 días en medio de diferenciación osteogénica con alginato. En la Figura

III.8A, se puede observar una disminución significativa de la actividad FAL en aquellas células cultivadas con el alginato comercial sin purificar (AC) respecto al control. Por otro lado, este efecto negativo sobre la actividad FAL es prevenido totalmente luego de la purificación del alginato comercial (ACP). Un resultado similar puede observarse cuando las fuentes de alginato extraídas del alga son agregadas al medio de cultivo. A su vez, la producción de Colt1 por las células cultivadas en presencia de los alginatos crudos fue significativamente menor con respecto a aquellas crecidas con los polímeros purificados (Figura III.8B), evidenciando, además, un aumento en la producción de colágeno en presencia de las muestras ACP y ANP al compararlas con la condición control ($p < 0.01$)



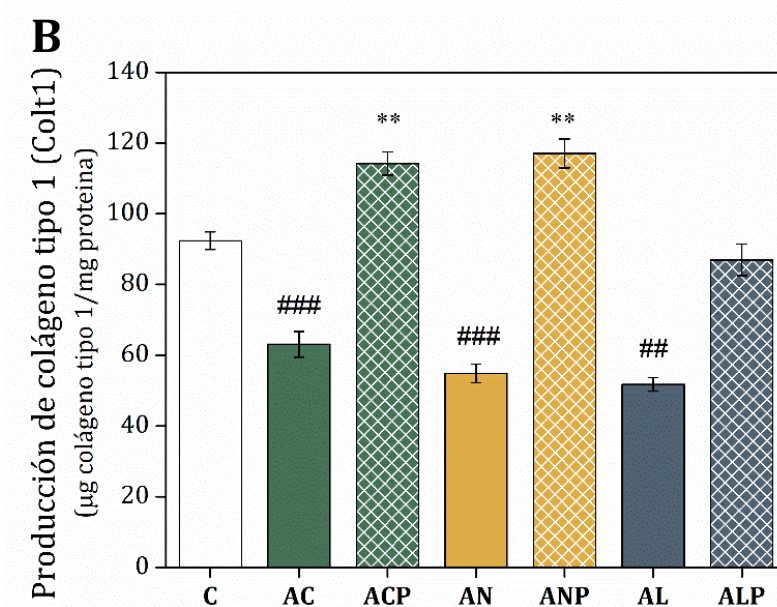


Figura III.8. Biocompatibilidad de alginatos para CPMO luego de 14 días de cultivo en medio de diferenciación osteoblástica en presencia de las muestras de alginato para determinar A) actividad de fosfatasa alcalina (FAL) y B) producción de colágeno tipo 1 (Colt1). *: $p < 0.05$ vs. control (C); **: $p < 0.01$ vs. C; #: $p < 0.05$ vs. alginato purificado, ##: $p < 0.01$ vs. alginato purificado y ###: $p < 0.001$ vs. alginato purificado.

La formación de fibras de colágeno puede ser influenciada por factores tales como pH, fuerza iónica, temperatura y la presencia de azúcares en el entorno extracelular [Bard & Chapman, 1973; Cooper, 1970; Kuznetsova et al., 1998]. En base a esto, varios autores consideraron la posibilidad de que la presencia de alginato, un polisacárido aniónico, pueda influir en la formación de fibras de colágeno. Igarashi y colaboradores [Igarashi et al., 2010] evaluaron la producción de colágeno en CPMO encapsuladas en perlas de alginato comercial purificado y diferenciadas a fenotipo condrogénico, observando un aumento en la expresión de este marcador con respecto al alginato comercial sin ningún tratamiento previo. A su vez, Jork y su grupo [Jork et al., 2000] observaron la formación de una cubierta de colágeno alrededor de perlas de alginato purificado encapsuladas con condrocitos, lo cual favoreció la viabilidad y adhesión de este tipo de células por más de cinco meses sin una disminución apreciable de su función. A pesar de la diferencia en el fenotipo celular y el tipo de presentación experimental utilizado para el alginato, los resultados observados en la Figura III.8 están en concordancia con los obtenidos por otros autores, en los que se evidenció que la purificación de alginato tiene un efecto directo sobre la expresión de colágeno.

III.3.4.3 Evaluación de citotoxicidad

Para ser utilizados en aplicaciones biomédicas, los materiales deben poseer baja o nula toxicidad. Para evaluar si las muestras de alginato antes y después de la purificación podrían generar cualquier efecto citotóxico, se empleó el modelo de macrófagos murinos RAW 264.7. Estos macrófagos tienen la capacidad de reaccionar frente a cuerpos extraños produciendo y liberando mediadores de inflamación tales como interleuquina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF α) y óxido nítrico (NO), y por ello representan un buen modelo para investigar la citotoxicidad de los biomateriales. En el presente trabajo se evaluaron los niveles de NO liberados al medio de cultivo por los macrófagos luego de 48 h (Figura III.9). En concordancia con los estudios realizados en las secciones anteriores, el agregado de alginato impuro al cultivo de células RAW 264.7 estimuló la liberación de NO cuando se lo comparó con la respuesta de células crecidas sobre un plato de cultivo estándar (condición control) ($p < 0.001$), mientras que no se observaron diferencias significativas en la producción de este mediador en las muestras purificadas. Se realizó también un control positivo de citotoxicidad, agregando lipopolisacárido (LPS) al medio de cultivo en una concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como consecuencia, pudo observarse que el agregado de LPS produjo un aumento significativo ($p < 0.001$) en la producción y liberación de NO al medio de cultivo tanto respecto a la condición control como a los valores obtenidos en las células cultivadas en presencia de los alginatos purificados. De esta manera, los actuales resultados sugieren que las impurezas presentes en los extractos de alginato inducen un efecto tóxico que podría desencadenar una respuesta inflamatoria, que puede ser evitada gracias al empleo de un paso de purificación simple.

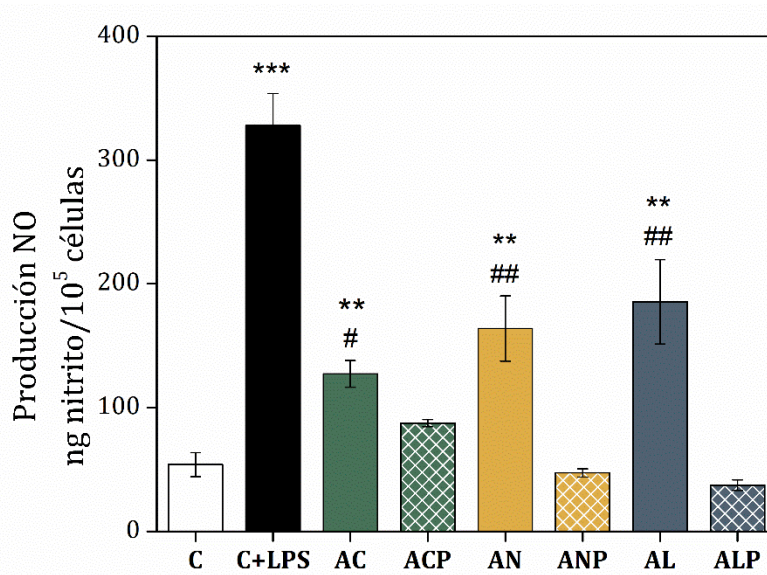


Figura III.9. Producción de NO luego de 48 h de incubación con alginatos de sodio. **: p<0.01 vs. control (C); ***: p<0.001 vs. C; #: p<0.05 vs. alginato purificado, ##: p < 0.01 vs. alginato purificado.

Además, se estudió la morfología de las células RAW 264.7 como evidencia adicional del efecto citotóxico de los contaminantes (Figura III.10). Como se mencionó anteriormente, los macrófagos son extremadamente sensibles a sustancias tóxicas y cuerpos extraños, por lo que cuando son activados, su morfología cambia desde una forma redondeada a un tipo dendrítico. Puede observarse que las células creciendo en discos de cultivo estándar presentan una morfología pequeña y redondeada con algunas extensiones citoplasmáticas (Figura III.10A). Por otro lado, luego de la adición de AC, AN y AL; las células mostraron un citoplasma extendido y vacuolado con varias extensiones citoplasmáticas, sugiriendo la activación de los macrófagos (Figuras III.10D, F y H). Se pueden observar alteraciones similares en la morfología celular cuando las células son crecidas sobre platos de cultivo celular expuestas a lipopolisacárido (LPS) (Figura III.10B). Sin embargo, luego de la purificación, los alginatos no indujeron cambios en la morfología celular, sugiriendo nula o muy baja citotoxicidad (Figuras III.10C, E y G). Diferentes autores reportaron cambios morfológicos similares, así como el aumento de diferentes citoquinas proinflamatorias al comparar alginatos comerciales sin tratamiento de purificación con alginatos comerciales ultrapuros [Kurachi et al., 2005; Iwamoto et al., 2005]. Se ha demostrado que existe una relación entre los oligosacáridos del alginato y la producción de citoquinas por RAW 264.7, así como también se ha reportado que el alginato puede ser fagocitado por los macrófagos por incremento de

la vía de señalización de p38-MAPKs, la cual a su vez podría estimular la liberación de citoquinas [Iwamoto et al., 2005; Bi et al., 2017]. Estos resultados, además, concuerdan con la discusión desarrollada en la sección III.3.3.2 en donde se pudo concluir que un contenido mayor de monómero M no afecta la inmunogenicidad del alginato siempre y cuando este se encuentre purificado.

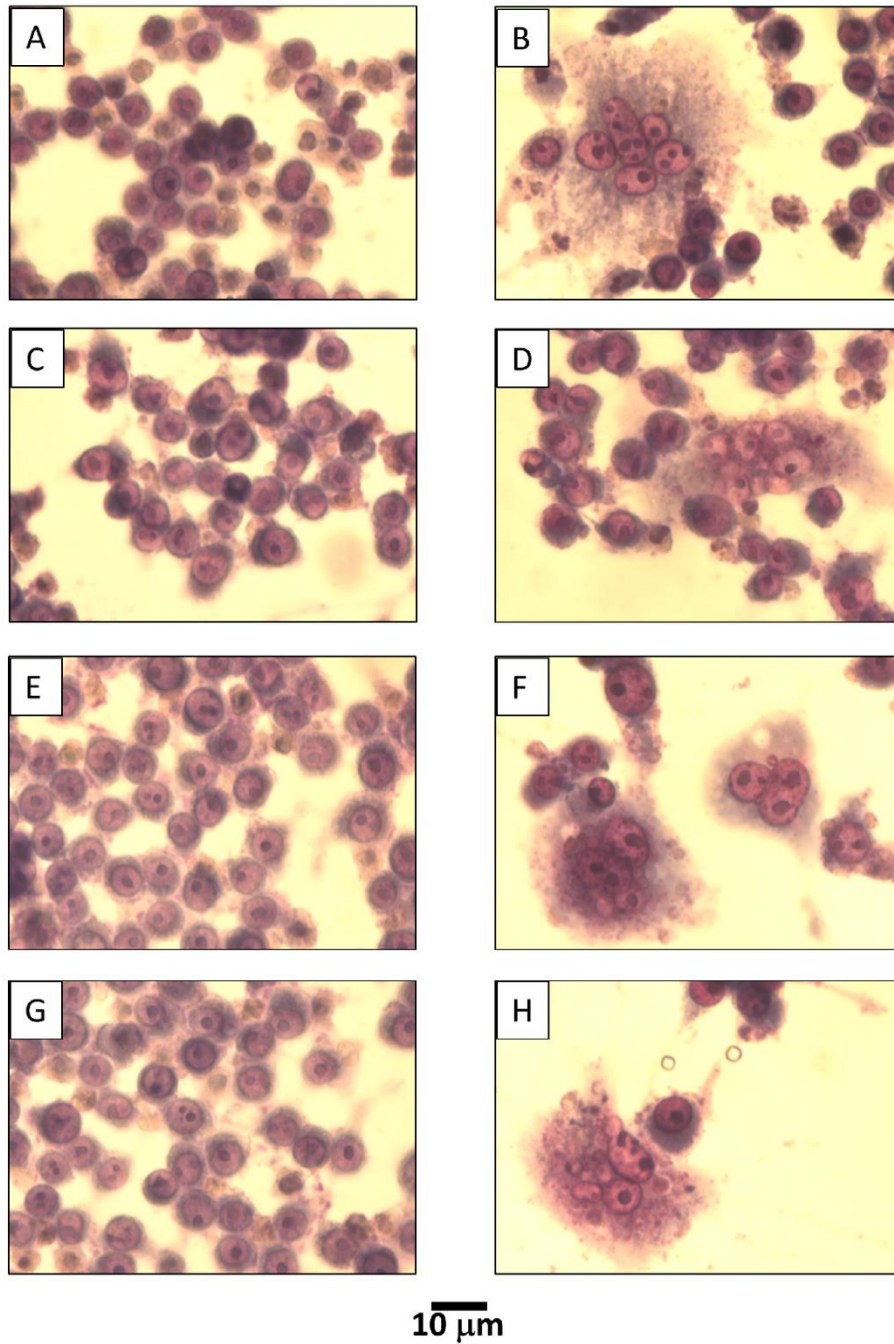


Figura III.10. Morfología celular de RAW 264.7. A) Control, B) LPS como control positivo de citotoxicidad, C) ACP, D) AC, E) ANP, F) AN, G) ALP y H) AL. Las fotografías muestran un campo representativo de los cultivos celulares en cada condición. Aumento 400x.

Como se ha discutido, algunas de las razones por las que el alginato se mantiene entre los polímeros naturales más utilizados para las aplicaciones biomédicas son: su baja citotoxicidad y capacidad de encapsular células metabólicamente activas sin dañarlas [Coviello et al., 2007]. Sin embargo, los alginatos derivados de algas, particularmente los que se encuentran disponibles comercialmente, poseen una gran variabilidad en cuanto a su composición, lo que pone en duda su biocompatibilidad [Orive et al., 2006]. Los resultados en este trabajo de tesis concuerdan con reportes anteriores [Dusseault et al., 2006; Wang et al., 2003] que describen las altas cantidades de polifenoles y proteínas como los grandes contaminantes del alginato, por lo que es necesario que el mismo sea sometido a un proceso de purificación para poder ser utilizado como un material en disciplinas tales como la Ingeniería de Tejido.

III.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se describe el aislamiento del alginato de sodio de nervadura y lámina de *Undaria pinnatifida*. Junto con el alginato de origen comercial, los mismos fueron caracterizados y se evaluó también la biocompatibilidad y citotoxicidad *in vitro*. Se observó que estas muestras poseían impurezas tales como polifenoles y proteínas, que causaron un efecto tóxico en macrófagos RAW 264.7 desfavoreciendo, además, la proliferación y diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico en células CPMO. Por lo tanto, se demostró que un proceso simple de purificación disminuye las impurezas a un nivel tan bajo que el efecto tóxico inicial de los alginatos crudos puede ser prevenido sin producir cambios relevantes en las características fisicoquímicas del alginato.

En conclusión, para que un alginato pueda ser utilizado en aplicaciones biomédicas tal como la Ingeniería de Tejido, este debe ser purificado adecuadamente para minimizar el riesgo de una respuesta inmune mediada por los contaminantes que se encuentran en los alginatos crudos y así obtener un material biocompatible con baja toxicidad, independientemente de cuál sea la fuente para su obtención, comercial o natural.

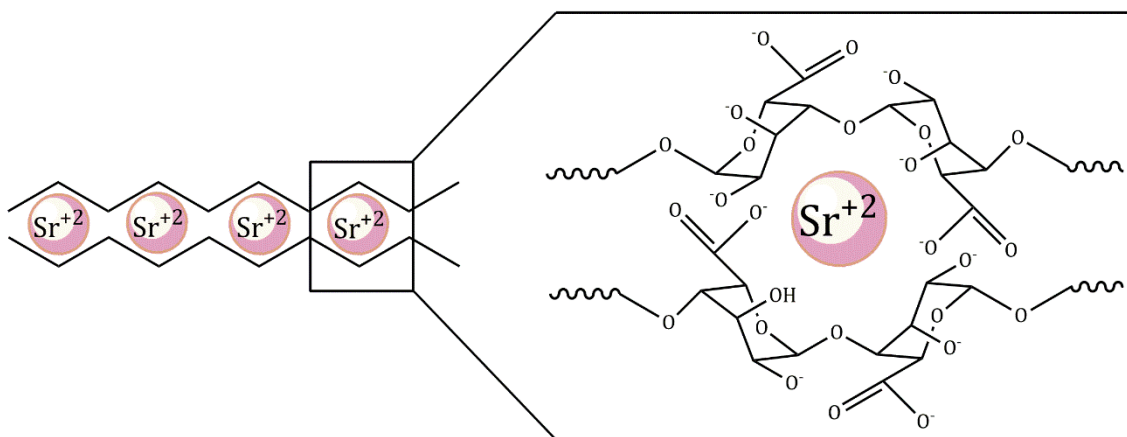
CAPÍTULO IV:

**Obtención y caracterización
de un sistema de
liberación de Sr^{+2} a partir de
entrecruzamiento iónico
con alginato de sodio**

IV.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en el capítulo anterior, el alginato es un polisacárido con capacidad de formar geles a través de uniones iónicas con cationes divalentes, una particularidad que lo hace único al compararlo con otros polianiones. Esta propiedad se encuentra directamente relacionada con su composición [Haug, 1964] y la afinidad por los cationes divalentes está dada de manera exclusiva por los bloques poliguluronato (poliG) que componen la estructura del polímero natural. Se conoce que la selectividad por los metales aumenta marcadamente con el incremento en el contenido de bloques de α -L-guluronato (G) en el polisacárido, mientras que los bloques de polimanuronato (poliM) y los bloques de residuos alternados MG prácticamente no muestran selectividad, aunque sí se ha demostrado que los iones Ca^{+2} pueden unirse de manera inespecífica al poliM [Smidsrød et al., 1973; Smidsrød, 1974; Mørch et al., 2006]. A su vez, la afinidad del alginato por estos metales aumenta en el orden $\text{Mg}^{+2} \ll \text{Ca}^{+2} < \text{Sr}^{+2} < \text{Ba}^{+2}$.

La gran selectividad entre iones similares, como los metales alcalinotérreos, indica que las interacciones electrostáticas no son el único mecanismo de unión de estos iones con el alginato, sino que las características estructurales de los bloques G contribuyen a la diferencia de afinidad con los metales divalentes. Esta propiedad fue explicada como el modelo “caja de huevo” [Grant et al., 1973], basada en la unión iónica (di-axial) entre los residuos G. En este modelo los cationes divalentes están unidos de manera coordinada con los grupos carboxilo de las subunidades G (Esquema IV.1)



Esquema IV.1. Modelo “caja de huevo” de entrecruzamiento de alginatos con iones Sr^{+2} .

Esta característica es propia del polímero, por lo tanto, hace que los alginatos que presentan grandes regiones de bloques G formen geles resistentes, mientras que aquellos con mayor contenido de M producen geles de fuerza intermedia, pero con resistencia a la separación de fases [Escalona et al., 2005].

IV.1.1 Ranelato de estroncio (RaSr)

El ranelato de estroncio (RaSr) es una sal orgánica utilizada como medicamento anti-osteoporótico empleada principalmente en el tratamiento de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Esta molécula está compuesta por una fracción orgánica (ácido ranélico) y dos átomos de Sr^{+2} . El principio activo es el Sr^{+2} que, a diferencia de otros anti-osteoporóticos, presenta un mecanismo de acción dual, ya que inhibe la actividad osteoclástica disminuyendo la resorción ósea y estimula la actividad osteoblástica, incrementando la formación de hueso. El Sr^{+2} , por analogía con el Ca^{+2} , puede actuar uniéndose al receptor sensor de Ca^{+2} (CaRS) y de esta manera interviene tanto un aumento en la apoptosis de osteoclastos como en la replicación de preosteoblastos y osteoblastos [Hurtel-Lemaire et al., 2009; Coulombe et al., 2004; Caverzasio, 2008].

Mediante ensayos *in vitro* con células mesenquimales derivadas de médula ósea y osteoblastos inmaduros, se encontró que RaSr regula la expresión de varios marcadores osteoblásticos, generando un aumento en la actividad de fosfatasa alcalina (FAL), producción de colágeno tipo 1 (Colt1), sialoproteína ósea (SPO) y osteocalcina (OCN) [Bonnelye et al., 2008; Atkins et al., 2009; Zhu et al., 2007], resultados que no se encontraron en osteoblastos maduros. El efecto positivo de este agente sobre la diferenciación preosteoblástica resulta en un incremento en la formación de nódulos de mineralización. También, en trabajos previos de nuestro grupo, se ha demostrado un efecto directo de Sr^{+2} (tanto en su forma RaSr como SrCl_2) en la enzima FAL, proveniente de extractos de células de la línea establecida UMR106, encontrándose además un aumento de afinidad de la enzima por su sustrato, de manera dependiente de la concentración de Sr^{+2} [Fernández et al., 2014 b].

Por otro lado, existe una sólida evidencia que, en humanos, en estudios clínicos controlados, los efectos del RaSr en el hueso se traducen en una disminución en el riesgo de fracturas. Esto fue documentado en dos extensos ensayos clínicos de fase III: SOTI (intervención terapéutica de osteoporosis espinal) y TROPOS (tratamiento de osteoporosis periférica). En el primero se evaluó el efecto de RaSr sobre el riesgo de fracturas vertebrales [Meunier et al., 2004] y, en TROPOS, el efecto sobre fracturas no espinales [Reginster et al., 2005]. Estos ensayos mostraron que el tratamiento con RaSr redujo significativamente el riesgo relativo de experimentar una nueva fractura vertebral en comparación con el grupo placebo del primer año de tratamiento y, además, redujo el riesgo de sufrir fracturas no vertebrales y de cadera.

Sin embargo, recientemente se han reportado estudios que indicaron un mayor riesgo de infarto de miocardio en mujeres tratadas con ranelato de estroncio, con una estimación de incidencia anual de 5.7 casos cada 1000 pacientes al año, contra 3.6 casos de 1000 pacientes al año tratados con placebo [EMA, 2013]. Estos resultados llevaron a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) a contraindicar el uso de RaSr en pacientes con antecedentes de enfermedad cardiovascular y, en vista de la asociación entre los tratamientos con el fármaco y un riesgo cardiovascular incrementado, a partir de agosto de 2017 la compañía Servier decidió interrumpir su comercialización [Drug and Therapeutics bulletin, 2017]. En paralelo, en nuestro laboratorio se demostró mediante ensayos *in vitro* que, la administración de Sr⁺² a células de músculo liso obtenidas de aorta de ratas, produjo una transdiferenciación hacia el fenotipo osteoblástico [Molinuevo et al., 2017].

La suspensión de RaSr como droga sistémica es un claro ejemplo de que el enfoque clásico para la administración de fármacos, tal como la ingesta oral de comprimidos o inyecciones subcutáneas, puede poseer algunas limitaciones y/o efectos adversos. Este tipo de tratamiento puede provocar concentraciones riesgosamente altas de droga en el organismo con una pobre incidencia en el tejido de interés, lo que puede desencadenar efectos colaterales severos y baja eficiencia de acción [Mazué et al., 1993]. Por su parte, los hidrogeles de alginato pueden ser utilizados para la liberación controlada, específicamente localizada, de fármacos encapsulados en el polímero; lo que es usualmente deseable para permitir concentraciones locales favorables y

sostenidas en el tiempo con una exposición mínima a otros tejidos [Langer, 1998; Langer, 2000].

Es por este motivo que se planteó el desarrollo de un material que libere Sr⁺² de manera localizada para así aprovechar su capacidad de estimular la regeneración ósea evitando, a su vez, el aumento en el riesgo de problemas cardiovasculares.

IV.1.2 Sistemas de liberación de droga

Se denomina *sistemas de liberación controlada o delivery de drogas* a la aplicación de principios químicos y biológicos para controlar la localización temporal y espacial de las moléculas de una droga activa *in vivo*, con el fin de obtener beneficios clínicos [Uchegbu & Schatzlein, 2006]. Estos sistemas buscan localizar el fármaco en el sitio de acción específico y suministrar la cantidad necesaria del mismo durante el tiempo requerido, con el propósito de mejorar la biodisponibilidad y disminuir los efectos no deseados. Existen dos tipos de sistemas de control de la liberación de un fármaco: espaciales y temporales [Díez Peña, 2002]. Los sistemas espaciales buscan dirigir la liberación del fármaco en un lugar específico a tratar para aumentar su biodisponibilidad en ese sitio, minimizando su alcance a otras partes del organismo donde podrían ocasionar efectos secundarios. Por otro lado, los sistemas de control temporal se utilizan para regular la velocidad de liberación del fármaco y mantener una concentración terapéutica estable en el organismo, con el objetivo de prolongar los efectos terapéuticos y evitar que se produzcan fluctuaciones en sus niveles plasmáticos.

Un sistema de liberación puede crearse cuando se combina de manera adecuada un polímero natural o sintético con una droga determinada. La liberación de droga puede darse de manera constante durante un período de tiempo prologado, o bien estar promovida por la presencia de un entorno determinado u otro factor externo. De esta manera, podemos obtener dos tipos de sistemas en los que se almacena un fármaco: uno denominado reservorio y otro denominado matricial. En el primero, la droga se encuentra encapsulada por un film o membrana, generalmente de origen polimérico, que controla la velocidad de liberación. Por el contrario, en los sistemas matriciales, el fármaco se encuentra distribuido de manera homogénea en el interior de la matriz del

material y, por este motivo, no puede distinguirse el principio activo del compuesto que lo contiene [Uhrich et al., 1999; Peppas, 1997; Peppas et al., 2000].

Los sistemas de liberación también pueden clasificarse según el proceso que permite la liberación del sitio activo.

IV.1.2.1 Liberación controlada por difusión

Este mecanismo ocurre cuando el dispositivo se coloca en un medio acuoso y el fármaco difunde desde el interior del material hacia el medio externo, controlado por un gradiente de concentración. Es el sistema de liberación más común y ocurre, en su gran mayoría, en sistemas de tipo reservorio y matricial.

IV.1.2.2 Liberación controlada por erosión o biodegradación

En este sistema la velocidad de liberación es controlada por la velocidad de degradación del polímero, que a su vez depende principalmente del volumen de la matriz. Esto generalmente ocurre cuando se emplean polímeros biodegradables que liberan el fármaco al medio a medida que avanza el proceso degradativo.

IV.1.2.3 Liberación controlada por hinchamiento

Este mecanismo se aprecia en sistemas responsivos o adaptativos, que poseen la capacidad de modificar su estructura, generalmente su hinchamiento y tamaño, frente a estímulos externos. En este caso el fármaco migra hacia el exterior de la matriz o del reservorio como consecuencia de los cambios estructurales que se producen en el material.

Teniendo en cuenta lo expuesto hasta el momento, en este capítulo de tesis se presenta el desarrollo de membranas de alginato entrecruzadas iónicamente con Sr^{+2} como principio activo, para su evaluación como *scaffold* con un sistema de liberación de drogas con acción local para su aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo.

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1 Reactivos y drogas

- Cloruro de calcio (CaCl₂ 93%, Cicarelli)
- Cloruro de estroncio (SrCl₂ 99.9%, Sigma)
- Cultivo celular: medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM. En polvo, alto en glucosa, con L-glutamina y rojo de fenol. Sin HEPES, piruvato de sodio ni bicarbonato de sodio), Gibco®, Thermo Fisher Scientific. (Buenos Aires, Arg.). Material de cultivo celular, Nunc (CABA, Arg.).

IV.2.2 Obtención de hidrogeles

Para la preparación de hidrogeles entrecruzados iónicamente se utilizó alginato de sodio comercial (Sigma Aldrich, CAS Number 9005-38-3) del cual se preparó una solución al 2% p/v en agua destilada. La misma fue realizada con 24 h de anticipación, respecto del entrecruzamiento, para asegurar la correcta disolución del polímero. A su vez, los iones Ca⁺² y Sr⁺², obtenidos a partir de las sales CaCl₂ y SrCl₂, se utilizaron para realizar la gelación de alginato. Las membranas se prepararon directamente sobre placas de cultivo de 24 pocillos en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical. La solución de polímero fue esterilizada por autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 15 minutos y las soluciones de sales preparadas en agua bidestilada se esterilizaron por filtración con un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0.22 µm (Corning®). Luego, 1 mL de la solución de alginato se volcó en cada pocillo de las placas de cultivo y el entrecruzamiento se llevó a cabo con el agregado de 500 µL de una solución con una concentración de CaCl₂ 25 mM, junto con distintas concentraciones de SrCl₂ (0.05, 0.10, 0.25 o 0.5 mM). Se sintetizó un hidrogel sólo con iones Ca⁺² para ser utilizada como condición control. A su vez, cada una de estas variables fue sometida a 1, 12 y 24 h de gelación; dejando las placas en agitación constante durante el tiempo correspondiente en un agitador elíptico (Fábrica de aparatos científicos S.A.). Una vez finalizado el periodo de entrecruzamiento, los hidrogeles fueron congelados a -4°C durante la noche para su posterior secado por liofilización a -40°C; en un liofilizador Scientz 10N (Hinotek, China).

IV.2.3 Liberación de Sr⁺²

Para el análisis del perfil de liberación de Sr⁺² por parte de los hidrogeles se colocó 1 mL de DMEM en cada pocillo y se los mantuvo en una estufa de cultivo (Incubator HF 151 UV Heal Force®) a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Se recolectó el medio a 1, 2, 3 y 6 días y se monitoreó la cantidad del ion presente en el sobrenadante usando un espectrofotómetro de absorción atómica (AA-7000, Shimadzu). Esta técnica permite determinar la concentración de un elemento metálico utilizando, en este caso, un atomizador de llama para desolvatar y atomizar la muestra, excitando los átomos del analito con una lámpara cuyo brillo atraviesa la llama. La cantidad de luz absorbida después de pasar por la llama determina la cantidad del elemento, en este caso Sr⁺², existente en la muestra. Para relacionar la absorbancia con la cantidad de ion presente se realizó una curva de calibración con un estándar de Sr⁺² de concentraciones entre 0.5 y 2 ppm en DMEM. Se utilizó un n=4 para cada condición.

El mecanismo de difusión de Sr⁺² hacia el exterior del hidrogel se estimó utilizando los datos experimentales, empleando el modelo Ritger-Peppas [Ritger & Peppas, 1987] a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_f} = kt^n \quad \text{Ecuación IV.1}$$

Donde k es una constante del sistema que depende de las características estructurales del polímero y su interacción con el disolvente y soluto (Sr⁺²). Por su parte, n es un exponente difusional que describe el mecanismo de transporte de agua en la membrana, es decir que otorga información sobre el mecanismo físico que controla la liberación del soluto. Por otro lado, M_t y M_f corresponden a la masa de droga acumulada al tiempo t y en el tiempo final del ensayo, respectivamente. Mediante los datos experimentales (hasta 60% de la liberación respecto del máximo, para la que se asume difusión unidimensional) se puede realizar un gráfico de log (M_t/M_f) frente a log t, en el cual el valor n se ve representado en la pendiente y k se obtiene a partir de la intersección de la recta con el eje Y. Para el caso particular de los hidrogeles diseñados en esta tesis, la geometría del sistema es la de un cilindro. Para estos sistemas los valores

posibles que puede adoptar n según el mecanismo de transporte existente se describen a continuación:

<i>Mecanismo de transporte</i>	Coeficiente difusional n	
	Película delgada	Geometría cilíndrica
<i>Transporte tipo Fickiano</i>	0.50	0.45
<i>Transporte anómalo</i>	$0.50 < n < 1.00$	$0.45 < n < 0.89$
<i>Caso II de transporte</i>	1.00	0.89
<i>Super caso II de transporte</i>	$n > 1.0$	$n > 0.89$

Tabla IV.1. Valores del exponente n en el modelo de Ritger-Peppas según el mecanismo de transporte involucrado para la geometría plana y cilíndrica. Tabla adaptada de Costa & Sousa Lobo [Costa & Sousa Lobo, 2001].

IV.2.4 Estudio de hinchamiento y degradación

Se estudió la capacidad máxima de hinchamiento en los hidrogeles obtenidos. Para ello, los mismos fueron congelados a -4°C y luego secados hasta peso constante en liofilizador (peso seco, w_0) y posteriormente fueron inmersos en agua destilada a 37°C . A intervalos regulares de tiempo, las membranas fueron retiradas y pesadas nuevamente esta vez en estado húmedo (peso húmedo, w_s). Para la evaluación de cada condición se utilizó un $n=4$.

El contenido de agua absorbida por el *scaffold* se calculó como la diferencia entre w_s y w_0 , mientras que el porcentaje de hinchamiento (*swelling*, S_w) se definió como:

$$\%S_w = \frac{(w_s - w_0)}{w_0} \times 100 \quad \text{Ecuación IV.2}$$

Además, se analizó la degradación de los hidrogeles ocasionada luego del estudio de hinchamiento. Para ello, al final de cada período de tiempo evaluado, se retiraron las muestras del agua destilada y se congelaron a -4°C durante la noche para su posterior liofilización hasta peso constante (peso final seco, w_d). De esta manera, se pudo comparar el peso inicial seco (w_0) de las muestras con el peso final seco (w_d) usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{(w_0 - w_d)}{w_0} \times 100 \quad \text{Ecuación IV.3}$$

IV.2.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y, a menos que se indique lo contrario, se obtuvieron a partir de al menos dos experimentos separados realizados por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey con el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ para todos los análisis estadísticos.

IV.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1 Obtención de hidrogeles

En este trabajo se pretendió desarrollar un *scaffold* para ser utilizado en Ingeniería de Tejido Óseo, con la capacidad de funcionar como sistema de liberación de Sr^{+2} como droga osteoinductora. Estudios previos realizados *in vitro* en nuestro grupo [Fernández et al., 2013] demostraron que concentraciones de RaSr cercanas a 0.1 mM resultan óptimas para el incremento de la función y actividad osteoblástica. Además, se ha reportado que los niveles séricos de Sr^{+2} en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis en tratamientos a largo plazo con RaSr se encuentran entre los 0.1-0.2 mM [Marie, 2008]. Es por ello que se seleccionaron concentraciones de Sr^{+2} que pudiera, luego de su liberación, alcanzar una concentración de 0.1 mM. Sin embargo, luego de realizar algunos ensayos preliminares, se observó que los hidrogeles no poseían una estabilidad adecuada para su aplicación como soporte en el sitio de lesión. Por lo tanto, para aumentar la estabilidad del material sin incrementar la concentración de Sr^{+2} , la cual podría llegar a tener efectos tóxicos, se procedió a realizar entrecruzamientos con el agregado de Ca^{+2} a distintos tiempos de gelación.

En la siguiente imagen se muestran las membranas obtenidas con concentraciones de Sr^{+2} de 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mM a 1, 12 y 24 h de gelación (Imagen IV.1). En todos los casos los hidrogeles se aditivaron con una solución de ion Ca^{+2} 25 mM con el objetivo de favorecer el entrecruzamiento iónico de manera estable en caso de que las concentraciones del primer ion no fueran suficientes para lograrlo. También se preparó una membrana sin Sr^{+2} como condición control.

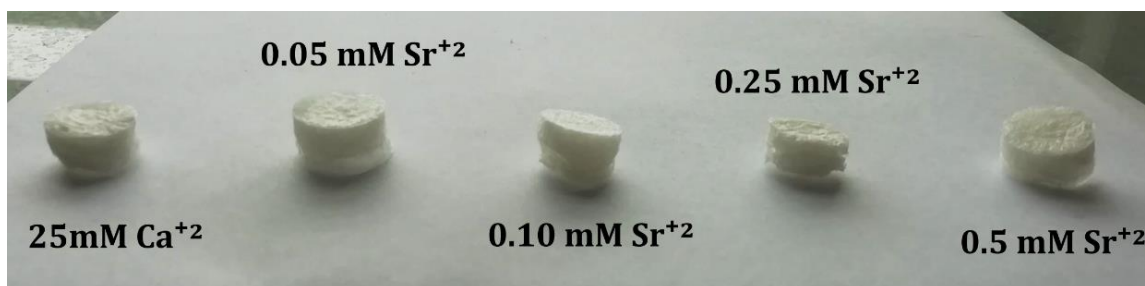
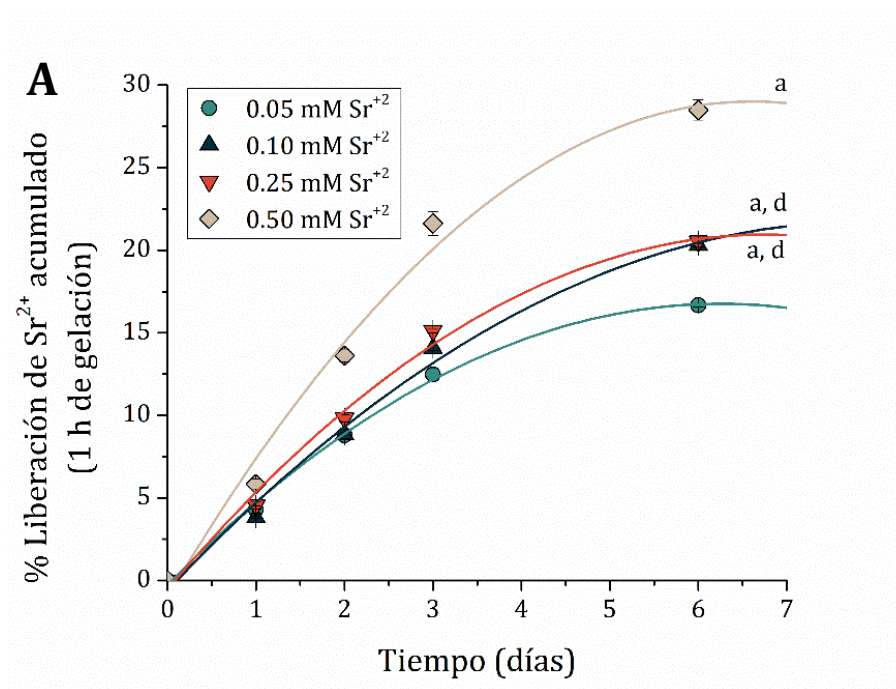


Imagen IV.1. Hidrogeles en estado seco luego de 24 h de gelación.

IV.3.2 Liberación de Sr⁺²

La cinética de liberación del ion Sr⁺² a partir de los hidrogeles obtenidos se evaluó luego de 1, 2, 3 y 6 días; se estudiaron los perfiles de liberación y se evaluó el mecanismo de transporte del catión involucrado en este proceso, desde la matriz polimérica.

En la Figura IV.1A se exhibe el perfil de liberación de los materiales luego de 24 h de gelación. En ella, se puede observar que con el transcurso del tiempo, la liberación del catión aumenta de manera constante y de forma dependiente con la concentración de Sr⁺² utilizada para preparar el *scaffold*, de tal manera que el porcentaje del ion que difundió al medio luego de 6 días de cultivo fue de 10.7%, 12.3%, 13.6% y 17.1% para las concentraciones 0.05 mM, 0.1 mM, 0.25 mM y 0.5 mM respectivamente. En el caso de los hidrogeles con 1 y 12 h de gelación se observó un comportamiento similar, es decir, la liberación de Sr⁺² aumenta con la concentración de estroncio utilizada en el hidrogel.



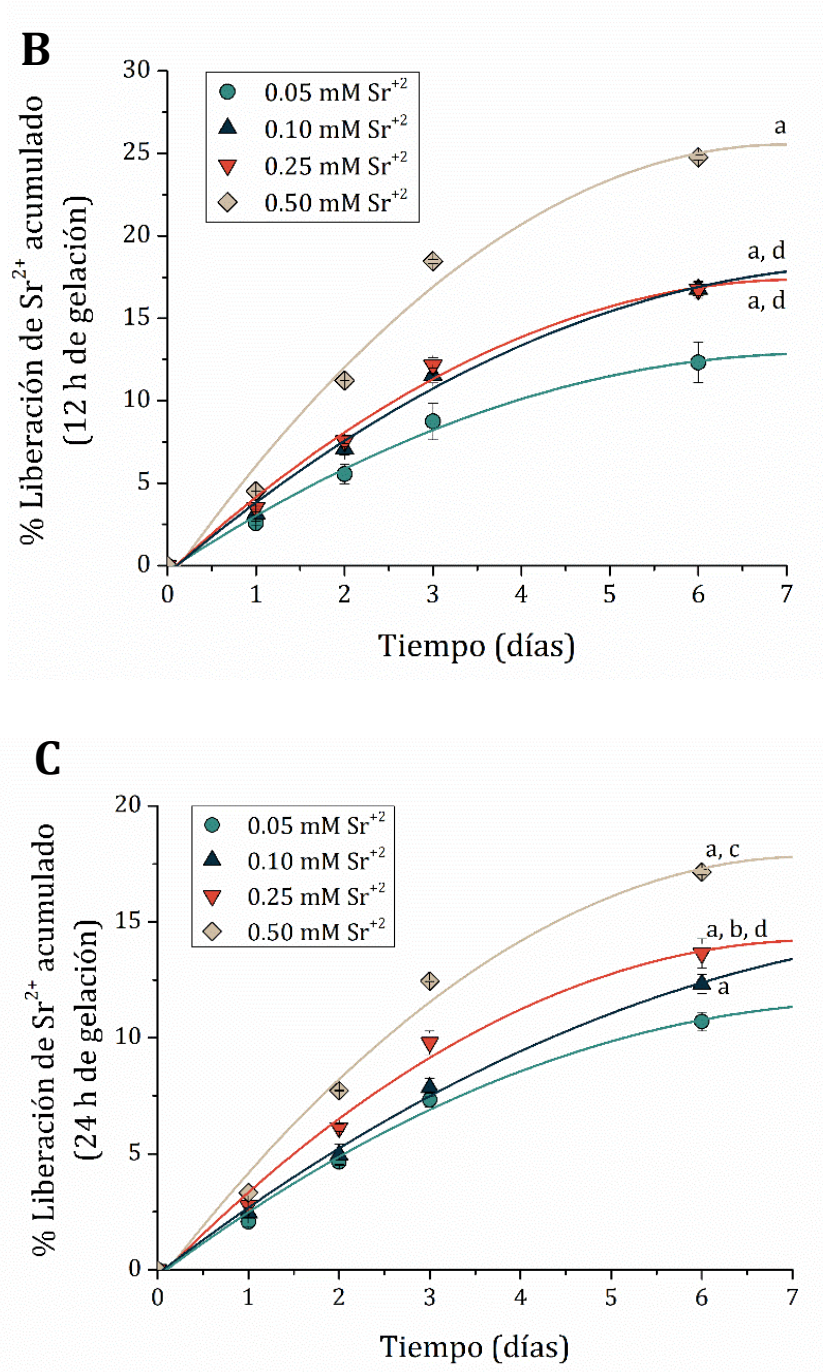


Figura IV.1. Liberación de Sr^{+2} a 1, 2, 3 y 6 días en hidrogel con A) 1 h de gelación B) 12 h de gelación C) 24 h de gelación. a: $p < 0.001$ vs 0.05 mM Sr^{+2} , b: $p < 0.01$ vs 0.10 mM Sr^{+2} , c: $p < 0.5$ vs 0.25 mM Sr^{+2} , d: $p < 0.001$ vs 0.50 mM Sr^{+2} .

A su vez, en la Figura IV.2 se muestran los porcentajes de liberación de Sr^{+2} luego de 6 días de cultivo para todos los hidrogel con 1, 12 y 24 h de gelación. Cuando se evalúa la difusión del ion en hidrogel con la misma carga inicial, puede observarse claramente que el tiempo de gelación tiene una influencia directa en la liberación, siendo esta inversamente proporcional al tiempo de gelación. Tal es el caso de los

hidrogeles con 0.5 mM de Sr^{+2} , en los cuales puede apreciarse que el porcentaje de liberación fue de 28.5%, 24.8% y 17.1% para 1, 12 y 24 h de gelación, respectivamente. Este mismo comportamiento fue observado para los hidrogeles restantes.

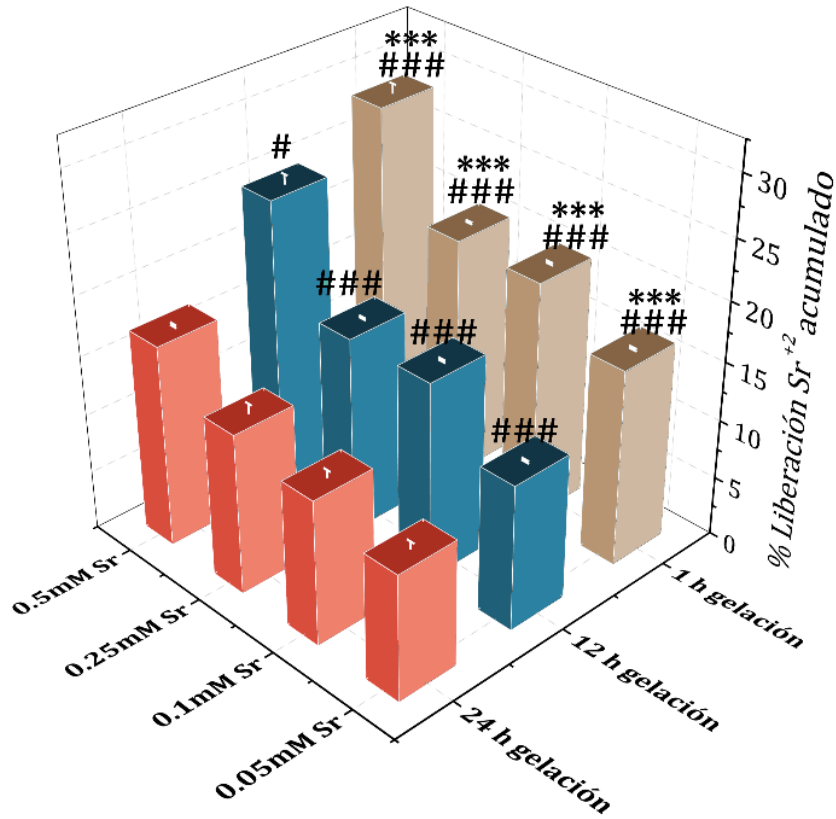


Figura IV.2. Liberación de Sr^{+2} luego de 6 días de cultivo para hidrogeles de 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mM formados luego de 1, 12 y 24 h de gelación. ***: $p < 0.001$ vs. 12 h gelación, #: $p < 0.5$ vs 24 h gelación, ###: $p < 0.001$ vs 24 h gelación.

El método de gelación utilizado consiste en un proceso de intercambio iónico entre el Na^+ del alginato de sodio soluble en agua y los iones Sr^{+2} de la sal de SrCl_2 para obtener el gel en transición. Se ha demostrado que la gelación puede encontrarse distribuida de manera heterogénea en el alginato, ya que la mayor concentración de cationes divalentes se concentra en la superficie y disminuye de manera gradual hacia el centro del gel [Draget, 2009]. Se han reportado distribuciones muy variadas [Skjåk-Bræk et al., 1989], en donde la formación del gel se presenta en gran medida en la superficie, siendo prácticamente nula la presencia del mismo en el centro de la membrana. Estos autores indicaron que la difusión de iones crea una zona clara de gelificación que se mueve desde la superficie al centro del gel. El grado de homogeneidad en los hidrogeles de alginato puede ser controlado utilizando distintos

parámetros, que involucran la concentración de iones, la cantidad de tiempo en la que el alginato se encuentra en presencia de los mismos y el peso molecular del polímero. Esto indicaría, por lo tanto, que un mayor tiempo de gelación da lugar a una mayor difusión de los cationes hacia el centro de los hidrogeles, estimulado a su vez por la agitación, permitiendo la formación de interacciones iónicas más estables y que, por lo tanto, limitan la liberación de iones como el Sr⁺².

A partir de las curvas de liberación (Figura IV.1) para cada condición de concentración de Sr⁺² y tiempo de gelación utilizados, se procedió al análisis de los mecanismos de transporte asociados al proceso de liberación del principio activo desde el polímero. Para ello se utilizó el modelo de Ritger-Peppas, el cual proporciona información a partir del valor del exponente n de la ecuación matemática correspondiente (Ecuación IV.1). En el primer caso de la Tabla IV.1, el valor de $n = 0.50$ para geometría plana y $n = 0.45$ para geometría cilíndrica se corresponde con un mecanismo de Tipo Fickiano (Caso I), donde la velocidad de difusión del agua es el proceso limitante, es decir que el soluto se libera por el pasaje del solvente a través de la membrana. La situación en que un valor de $0.50 < n < 1$ indica un proceso de difusión no-Fickiano de tipo anómalo en el que la relajación de las cadenas poliméricas determina la velocidad de absorción del agua y, por lo tanto, la difusión del soluto a estudiar. El caso límite, denominado transporte de Caso II, se define para $n = 1$ e indica que la liberación de la droga corresponde a una cinética de orden cero en donde la velocidad de difusión del agua es superior a la velocidad de relajación de las cadenas del polímero; en esta condición, la liberación del principio activo es directamente proporcional al tiempo e independiente de su concentración [Ganji et al., 2010; Costa & Sousa Lobo, 2001]. Para las formas cilíndricas, el valor de n referente al Caso II de transporte es de 0.89.

Por último, cuando $n > 1$ se observa una forma extrema de transporte denominada Super Caso II. Todos los valores calculados que se presentan en la Tabla IV.2 mostraron este último comportamiento, cuyo fundamento involucra en su desarrollo un proceso de plastificación como consecuencia de una disminución de las fuerzas atractivas entre las cadenas del polímero, que acelera la absorción de solvente

sobre el final del proceso de penetración, y resulta en un aumento en la movilidad de las cadenas poliméricas [Ritger & Peppas, 1987; Llabot et al., 2004].

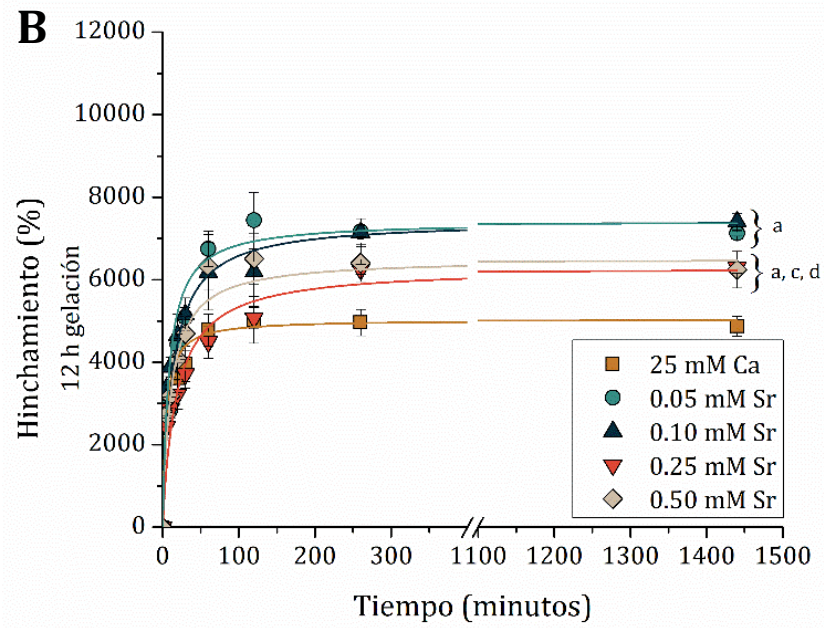
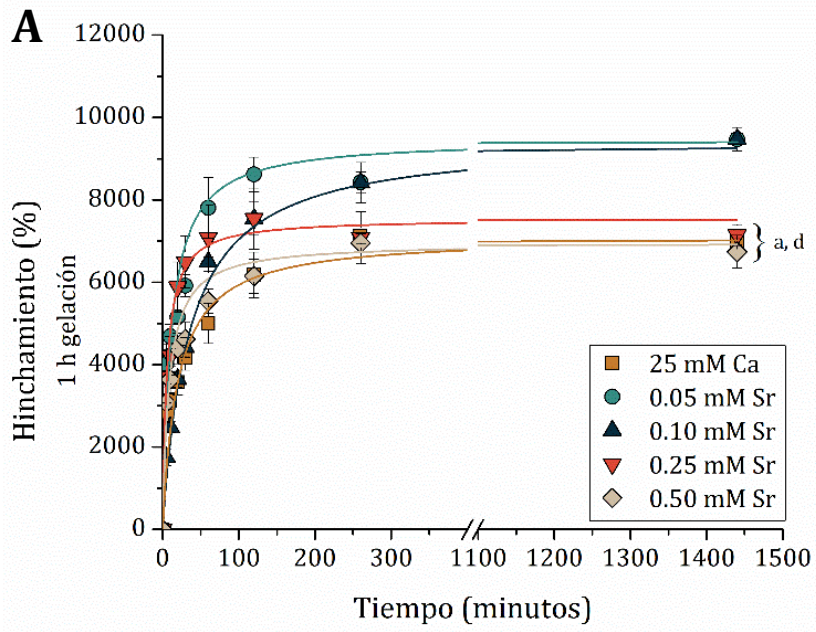
Concentración Sr ⁺² (mM)	<i>n</i> 1 h gelación	<i>n</i> 12 h gelación	<i>n</i> 24 h gelación
0.05	1.03	1.11	1.17
0.1	1.20	1.01	1.16
0.25	1.11	1.14	1.10
0.5	1.22	1.21	1.31

Tabla IV.2. Exponente difusional *n* para hidrogeles preparados con diferentes concentraciones de Sr⁺², luego de 1, 12 y 24 h de gelación.

IV.3.3 Estudio de hinchamiento y degradación

Durante el estudio de la cinética de hinchamiento en agua y a 37°C, todos los hidrogeles sintetizados a 1, 12 y 24 h de gelación mostraron un rápido incremento durante los primeros 5 minutos para luego alcanzar el equilibrio a los 120 minutos (2 h). En la Figura IV.3 puede apreciarse que en todas las membranas el porcentaje máximo de hinchamiento superó el 4000%, logrando alcanzar valores de 10000% para algunos casos.

En la Figura IV.3A se encuentran representados los perfiles de hinchamiento para los cinco hidrogeles a 1 h de gelación. Aquellos correspondientes a 0.05 mM y 0.10 mM Sr⁺² presentaron un porcentaje de hinchamiento muy superior a las matrices con mayor concentración del metal. Es posible que la presencia de un mayor número de átomos de Sr⁺² favorezca la fuerza de las interacciones iónicas en la red de alginato, lo que implicaría la formación de redes más rígidas y, por lo tanto, con una menor tasa de hinchamiento. Un efecto similar se observa en la figura IV.3B, en hidrogeles con 12 h de gelación, en donde además se puede apreciar que la membrana que posee solo iones Ca⁺² tiene un porcentaje de hinchamiento aún menor que los materiales con ambos cationes. Sin embargo, esta tendencia no se observa en hidrogeles con 24 h de gelación (Figura IV.3C), indicando que posiblemente exista en este ensayo un factor adicional con influencia sobre la tasa de hinchamiento de las membranas, además de la afinidad de los cationes.



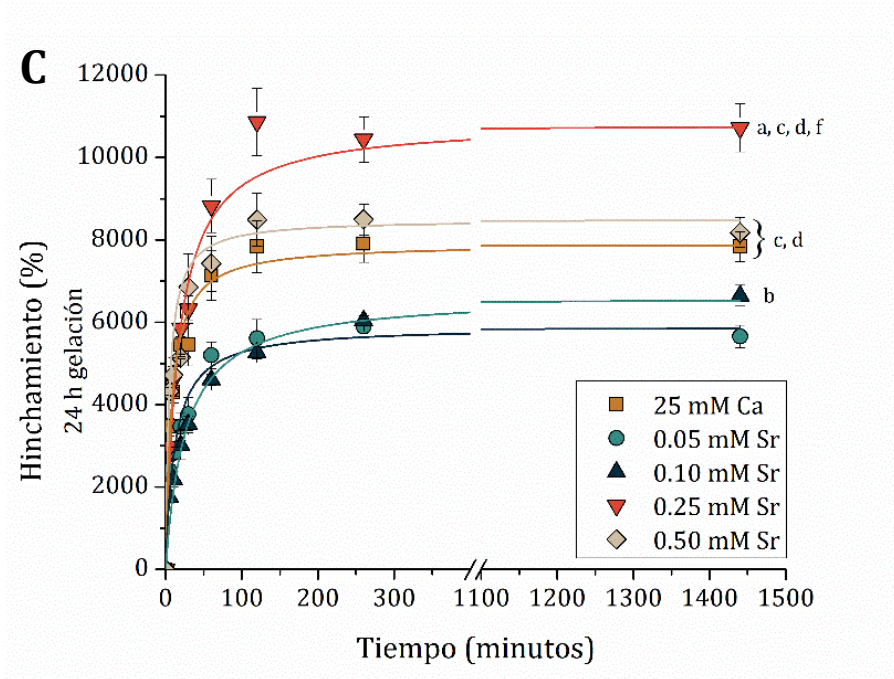


Figura IV.3. Hinchamiento de hidrogeles a 1, 12 y 24 h. a: $p < 0.001$ vs 25 mM Ca^{+2} ; b: $p < 0.5$ vs 0.05 mM Sr^{+2} ; c: $p < 0.001$ vs 0.05 mM Sr^{+2} ; d: $p < 0.01$ vs 0.10 mM Sr^{+2} ; f: $p < 0.001$ vs 0.50 Mm Sr^{+2} .

Con el objetivo de visualizar el efecto del tiempo de gelación en la estabilidad de los hidrogeles, se agregó el porcentaje final de hinchamiento de estos luego de 24 h en la Tabla IV.3. En este trabajo de tesis se planteó la posibilidad de gelificar el alginato a tres tiempos distintos, bajo la hipótesis de que cuanto mayor fuera el contacto de los iones con las cadenas del polímero, mejor sería la difusión de estos a lo largo de la matriz, por lo que se lograría obtener un hidrogel homogéneo con interacciones electrostáticas más estables que disminuirían la tasa de hinchamiento. Sin embargo, puede observarse que sólo los *scaffolds* 0.05 y 0.10 mM Sr^{+2} cumplieron con esta predicción. Por el contrario, en 0.25 y 0.50 mM Sr^{+2} se encontró el efecto inverso, mientras que en el control sólo con Ca^{+2} se observaron fluctuaciones en el hinchamiento sin una tendencia clara.

Hinchamiento (% luego de 24 h)

Concentración	1 h gelación	12 h gelación	24 h gelación
25 mM Ca ⁺²	6976 ± 84 ^{b, c}	4347 ± 240 ^d	7837 ± 363
0.05 mM Sr ⁺²	9473 ± 288 ^{b, d}	7123 ± 65 ^d	5655 ± 273
0.10 mM Sr ⁺²	9169 ± 126 ^{b, d}	7411 ± 201 ^d	6644 ± 252
0.25 mM Sr ⁺²	7144 ± 238 ^{a, d}	6297 ± 142 ^d	10718 ± 581
0.50 mM Sr ⁺²	6740 ± 400 ^c	6244 ± 443 ^d	8174 ± 360

Tabla IV.3. Porcentaje de hinchamiento para hidrogeles luego de 24 h. a: p<0.05 vs misma concentración a 12 h gelación ([12 h]), b: p<0.001 vs [12 h], c: p<0.01 vs misma concentración a 24 h gelación ([24 h]), d: p<0.001 vs [24 h].

Con lo mencionado hasta el momento, podría sugerirse que no existiría una correlación directa entre el hinchamiento y la concentración de Sr⁺² o el tiempo de gelación.

Al finalizar este estudio, se evaluó el porcentaje de degradación de los hidrogeles encontrando que, luego de 24 h en agua, la degradación fue de alrededor de 30% o más para todos los casos (Tabla IV.4). Estos resultados indican una gran pérdida de masa en un lapso muy acotado, obteniéndose con el paso del tiempo, hidrogeles muy frágiles con inestabilidad entre las cadenas poliméricas, lo cual genera una gran dificultad a la hora realizar una lectura correcta sobre el mecanismo de difusión del solvente en los hidrogeles.

Concentración	Degradación (%)		
	1 h gelación	12 h gelación	24 h gelación
25 mM Ca ⁺²	31.8 ± 2.7	34.8 ± 6.5	35.3 ± 7.6
0.05 mM Sr ⁺²	31.2 ± 5.5	26.1 ± 6.7	31.0 ± 3.9
0.10 mM Sr ⁺²	34.8 ± 2.2	28.9 ± 8.8	33.4 ± 3.0
0.25 mM Sr ⁺²	29.3 ± 1.7	36.0 ± 8.0	39.8 ± 6.6
0.50 mM Sr ⁺²	32.9 ± 4.9	35.2 ± 5.8	33.7 ± 3.2

Tabla IV.4. Porcentaje de degradación para hidrogeles de 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mM formados luego de 1, 12 y 24 h de gelación.

Bajpai y Sharma [Bajpai & Sharma, 2004] estudiaron el comportamiento de perlas de alginato entrecruzadas con Ca⁺². Ellos observaron que, después de lograr un

máximo de hinchamiento en buffer fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) las mismas comenzaban a perder peso hasta que finalmente se disolvían por completo. El mecanismo propuesto por los autores para explicar este comportamiento consiste, inicialmente, en el intercambio entre los iones Na⁺ de la solución externa y los iones Ca⁺² unidos de manera inespecífica a los grupos COO⁻ de las secuencias de polimánuronato. Como resultado, la repulsión electrostática entre los grupos carboxilo provoca la relajación de las cadenas, lo que favorece el hinchamiento del gel. Luego, avanzando en el proceso, los iones Ca⁺² unidos a los grupos COO⁻ de las unidades de poliguluronato (que forman la estructura de “caja de huevo”) también comienzan a intercambiar iones Na⁺ con el medio, provocando la desintegración de las perlas. En el presente trabajo de tesis se ha observado un comportamiento similar a pesar de no utilizar buffer fosfato como medio para el estudio que, incluso, coincide con el mecanismo difusivo del ion Sr⁺² hallado al evaluar su liberación en la sección IV.3.2. Esto corrobora que el agua destilada no se encuentra completamente libre de iones, ya que además se ha demostrado que la ausencia de Na⁺ tanto en agua desionizada como en buffers (por ejemplo, Tris-HCl) evita casi por completo el hinchamiento de los materiales entrecruzados [Bajpai & Sharma, 2004; Mørch et al., 2006].

Zhou y colaboradores [Zhou et al., 2018] sintetizaron redes poliméricas de poliacrilamida semi-interpenetradas con alginato, el cual fue entrecruzado iónicamente con soluciones al 0.1 M de los iones Cu⁺², Zn⁺², Sr⁺² y Ca⁺². Estos hidrogeles fueron sometidos a un ensayo de hinchamiento con PBS durante 100 h, en el cual todos los materiales mostraron porcentajes significativamente menores con respecto a un hidrogel control sin entrecruzamiento iónico. A su vez, el orden creciente de hinchamiento observado fue Sr⁺²<Cu⁺²<Zn⁺²≈Ca⁺², demostrando que este fenómeno está fuertemente ligado a la naturaleza del metal utilizado. Por otro lado, Bajpai & Sharma [Bajpai & Sharma, 2004] observaron que el hinchamiento en PBS de las perlas de alginato se reducía de manera inversamente proporcional a la concentración de la solución de CaCl₂ utilizada para su entrecruzamiento. Mørch [Mørch et al., 2006] fabricó perlas de los iones Ca⁺², Ba⁺² y Sr⁺² que gelificaron durante 10 minutos; utilizando alginatos con distinta composición de manurónico (M) y gulurónico (G): uno con alto contenido de M (F_M= 0.60) y otro con alto contenido de G (F_G=0.66); observando que el

radio de las perlas en solución salina se ve sumamente disminuido cuando el alginato rico en G es entrecruzado con Ba⁺² y Sr⁺² debido a la gran afinidad que tiene la subunidad de gulurónico por estos iones. A su vez, al aumentar a 24 h el tiempo de gelación de los materiales, se obtuvieron geles aún más compactos.

Todo lo mencionado anteriormente indica que el hinchamiento de los hidrogeles de alginato está directamente relacionado al tipo y concentración del ion utilizado, la relación M/G del polímero y el tiempo de gelación. Esto concuerda con la hipótesis propuesta en este trabajo, que plantea que para *scaffolds* de igual composición se obtienen materiales más estables y con hinchamientos menores cuanto mayor es el período de tiempo utilizado para la gelación. Varios autores concordaron en este sentido, independientemente del tipo de polímero o ion en particular utilizado en sus respectivos trabajos, lo que lleva a pensar que el método de síntesis para la formación de estos hidrogeles es determinante. El enfoque más común consiste en la síntesis de materiales entrecruzados por goteo del polímero en soluciones con el ion deseado, es decir, formando perlas. Sin embargo, este mecanismo solo resulta de utilidad para la carga de células o la liberación de drogas para uso inmediato. Otro método de síntesis es realizado a través de diálisis con sales de metales divalentes, pero se ha observado una gran dificultad a la hora de obtener geles homogéneos [Bajpai et al., 2016]. El mayor problema de estos mecanismos es que no permiten conocer la concentración exacta de carga del ion en el hidrogel, lo cual resulta fundamental en un sistema de liberación controlada. Es por ello que la síntesis descrita en la sección IV.2.2 fue adaptada para conocer la concentración de iones en la membrana, ya que el alginato absorbe la totalidad de las soluciones utilizadas, así como también para ajustarla a las condiciones de cultivo y trabajo de nuestro laboratorio. Sin embargo, como se ha observado, los resultados de hinchamiento y degradación demostraron que este no es el método adecuado para la formación de hidrogeles ya que el alginato se encuentra atrapado en los pocillos de las placas de cultivo con un volumen de solución limitado que no permite la difusión homogénea de los iones al interior del gel. Sin embargo, los mecanismos de síntesis propuestos por otros autores tampoco resultan adecuados, ya que los mismos han reportado una disolución inevitable de los hidrogeles o perlas entrecruzados

iónicamente que va desde horas a pocos días [Bajpai & Sharma, 2004; Augst et al., 2006; Mørch et al., 2006; Zhou et al., 2018].

La degradabilidad de un biomaterial es un factor principal en la regeneración de tejidos y la liberación de drogas. Este debe permitir la formación de tejido nuevo, actuar de soporte en los sitios de lesión, así como permitir la integración de células al tejido ya existente. Los hidrogeles de alginato entrecruzados iónicamente muestran una degradación rápida y poco controlada, lo cual resulta contraproducente cuando se busca un material que permita estabilizar una herida en tejidos que requieren varios meses para regenerarse.

IV.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se logró obtener hidrogeles de alginato con una gran capacidad de hinchamiento que, además, pueden actuar como sistema de liberación de droga. Sin embargo, los valores de degradación encontrados luego de 24 h demostraron que la matriz polimérica carece de la estabilidad requerida para su utilización como *scaffolds* en Ingeniería de Tejido. Por estos motivos, se decidió continuar en la búsqueda de un material estable y biocompatible basado en alginato, utilizando nuevos métodos de síntesis abordados en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO V:

**Diseño, caracterización
y propiedades de hidrogeles
semi-interpenetrados (sIPN)
con alginato de sodio**

V.1 INTRODUCCIÓN

La Ingeniería de Tejidos busca desarrollar y regenerar tejidos funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* para superar aquellas condiciones patológicas que requieren intervención quirúrgica. Esta disciplina está enfocada mayormente en el diseño de materiales biomiméticos que sean capaces de actuar como soportes para estabilizar el sitio de lesión proveyendo, además, un entorno favorable para el desarrollo de nuevos tejidos. Para cumplir con estos requisitos, un *scaffold* debe poseer características mecánicas y estructurales apropiadas para el sitio anatómico a implantar, ya que es necesario que el mismo soporte la carga fisiológica del organismo durante el proceso de regeneración. La micro y macro arquitectura de un biomaterial tiene una influencia crítica en la supervivencia, adhesión y proliferación celular; así como también en la diferenciación, vascularización y en la expresión de genes específicos [Bose & Bandyopadhyay, 2013; Dolcimascolo et al., 2019]. Por estos motivos, es que uno de los requerimientos más importantes en el diseño y desarrollo de materiales para esta disciplina consiste en la obtención de un sustituto biocompatible con capacidad de promover el desarrollo celular en la superficie y, eventualmente, al interior del *scaffold* tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, luego del implante, el mismo debe ser capaz de integrarse al tejido huésped sin generar una respuesta inmune que pueda derivar en una reacción inflamatoria que comprometa el tratamiento [Hutmacher, 2000; Dolcimascolo et al., 2019]. Otra propiedad fundamental en una matriz es su biodegradabilidad, ya que estos *scaffolds* no son implantes permanentes y deben degradarse para permitir que las células produzcan su propia matriz extracelular [Khan & Tanaka, 2018].

Biomateriales de este tipo pueden diseñarse utilizando una gran variedad de polímeros. Los mismos pueden sintetizarse a partir de la polimerización de uno o más monómeros, tanto por reacciones de homopolimerización (un solo tipo de monómeros) como por reacciones de copolimerización (dos o más tipos de monómeros). La estructura, largo de las cadenas moleculares, así como su estereoquímica pueden modificarse al variar diversos parámetros químicos y físicos durante su síntesis

[Mystkowska et al., 2017; Khan et al., 2013]. Por otra parte, este tipo de materiales también pueden extraerse de fuentes naturales mediante distintas técnicas. Esto permite que exista un amplio número de polímeros, ya sea de origen sintético y/o natural con diferentes características estructurales y macromoleculares para el diseño de un biomaterial. Esta disponibilidad, por lo tanto, permite crear materiales híbridos, compuestos por polímeros naturales y sintéticos que potencien sus propiedades individuales. Con este objetivo, en el presente trabajo de tesis utilizamos 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) como monómero y etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) (Imagen V.1) como entrecruzante, ambos reactivos sintéticos, para generar una red polimérica semi-interpenetrada con alginato de sodio como polímero natural. Los hidrogeles basados en HEMA son de gran interés debido a su capacidad de formar redes tridimensionales. Estos pueden ser diseñados para contener agua o fluidos biológicos sin disolverse, exhiben buenas propiedades mecánicas, estabilidad hidrolítica, permeabilidad al oxígeno y muy buena biocompatibilidad. Además, permiten el flujo de nutrientes y metabolitos solubles en agua. La gran transparencia obtenida a partir de los materiales sintetizados con HEMA y, por lo tanto, sus excelentes propiedades ópticas, ha hecho que estos sean muy utilizados en la industria oftalmológica como materia prima para la síntesis de lentes de contacto [Tomić et al., 2010; Yu & Ober, 2003; Samavedi et al., 2014]. Por otro lado, EGDMA es un monómero insaturado con dos dobles enlaces metacrílicos capaz de entrecruzar *in situ*, con nula citotoxicidad si es empleado a bajas concentraciones [Zhou et al., 2009].

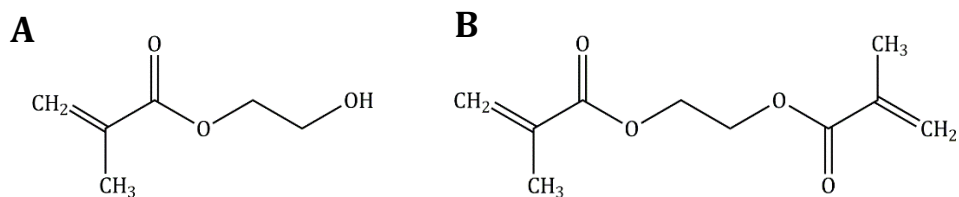


Imagen V.1. Estructura de A) Hidroxietil metacrilato (HEMA) y B) Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA).

Los homopolímeros de HEMA y EGDMA, así como los hidrogeles sintetizados a partir de sus monómeros, presentan buenas propiedades mecánicas pero una gran resistencia a la degradación. Por otro lado, se ha mencionado que el alginato posee una excelente biocompatibilidad y gran tasa de degradación, pero con pobres características

mecánicas. Por lo tanto, la combinación de estos polímeros tiene un gran potencial para modificar y mejorar sus propiedades para el desarrollo de *scaffolds* con aplicación en Ingeniería de Tejidos.

Por otra parte, se ha mencionado el rol fundamental de la biocompatibilidad y nula citotoxicidad para elegir un biomaterial que actúe como sustituto biológico. Para realizar una primera aproximación en la posible aplicación de un *scaffold*, el uso de modelos *in vitro* resulta ideal. El objetivo principal de los mismos consiste en simular las reacciones biológicas de los tejidos que se podrían generar frente a un determinado material. Este método ofrece una forma menos costosa para testear matrices, reduciendo la probabilidad de sorpresas al utilizarlos directamente sobre modelos animales o estudios pre-clínicos. Además, el paradigma actual establece una gran cantidad de razones éticas que limitan el uso de animales de experimentación al mínimo necesario: la iniciativa de las 3Rs (Reducir, Refinar y Reemplazar) impulsada por la Unión Europea ha resultado en una prohibición total del uso de animales para la prueba de ingredientes cosméticos desde el 2009 (<http://ec.europa.eu/>). De todas maneras, este tipo de modelos puede ser utilizado para la evaluación de tratamientos terapéuticos, pero solo con la implementación de protocolos estrictos de reducción y refinamiento [Hanks & Wataha, 1996; Rouwkema et al., 2011]. De esta manera, los modelos *in vitro* resultan inicialmente un estudio fundamental para conocer las interacciones célula-*scaffold* y la influencia de los materiales sobre la biocompatibilidad y citotoxicidad de las células.

V.1.1 Estudios *in vivo*

Los modelos *in vivo* son modelos experimentales que, por aproximación, proveen información relevante para establecer tratamientos clínicos más efectivos. Aunque los estudios *in vitro* son una gran contribución para comprender los mecanismos biológicos fundamentales que desencadenan los *scaffolds*, estos poseen varias limitaciones debido a su incapacidad de recrear condiciones fisiológicas y patológicas completas que permitan predecir su desempeño en un paciente. Los modelos *in vivo*, por lo tanto, resultan un paso fundamental para conectar las evaluaciones *in vitro* y las pruebas clínicas [Gomes & Fernandes, 2011].

Se han desarrollado un gran número de modelos animales para simular el entorno y las condiciones fisiológicas del humano *in vivo*. Entre estos se encuentran los ratones, ratas, conejos, perros, ovejas y cerdos. Sin embargo, para seleccionar adecuadamente el modelo a utilizar, existen varias consideraciones que deben tenerse en cuenta. En primera instancia, el animal elegido debe recrear un estado fisiopatológico que se corresponda adecuadamente con el cuadro clínico humano del tratamiento a estudiar. Además, es necesario que sea sencillo de observar y manipular, con el fin de estudiar un gran número de sujetos en un período de tiempo relativamente corto [Liebschner, 2004]. Por otra parte, el criterio de selección debe incluir los costos de adquisición y cuidado del animal, su disponibilidad, su aceptabilidad por la sociedad, la tolerancia al cautiverio y la comodidad del alojamiento [Li et al., 2015]. Por último, de acuerdo con parámetros internacionales, deben respetarse las 3Rs, lo que determinará el número de animales por grupo de estudio a utilizar, el tamaño de la herida, la cantidad de implantes por sujeto de investigación y la duración del tratamiento [Upman, 2006].

Debido a su tamaño pequeño y fácil manipulación, los roedores son los modelos animales más comunes, resultando muy útiles como una primera aproximación hacia los estudios pre-clínicos para la evaluación de biomateriales como sustitutos óseos. Sin embargo, como parte de sus limitaciones se observa que, a comparación de otros animales, estos poseen huesos largos más pequeños y frágiles. El modelo de estudio más común, y más simple, utilizado en roedores es el modelo de defecto óseo en calota (craneotomía). Uno de los motivos que hacen a este estudio tan popular entre los investigadores es que permite establecer un defecto uniforme, reproducible y estandarizado que es fácil de evaluar por análisis histológicos. A su vez, la localización del defecto no solo resulta quirúrgicamente accesible, sino que la duramadre y la piel superpuesta actúan como soporte para el material implantado, evitando que se deba realizar una fijación interna o externa [Gomes & Fernandes, 2011]. El método consiste en crear un defecto por incisión sagital a través del hueso parietal (Imagen V.2) irrigando con solución salina para prevenir el daño de hueso adyacente. Una vez realizado el implante, la piel es reposicionada y cerrada con suturas [McGovern et al., 2018].

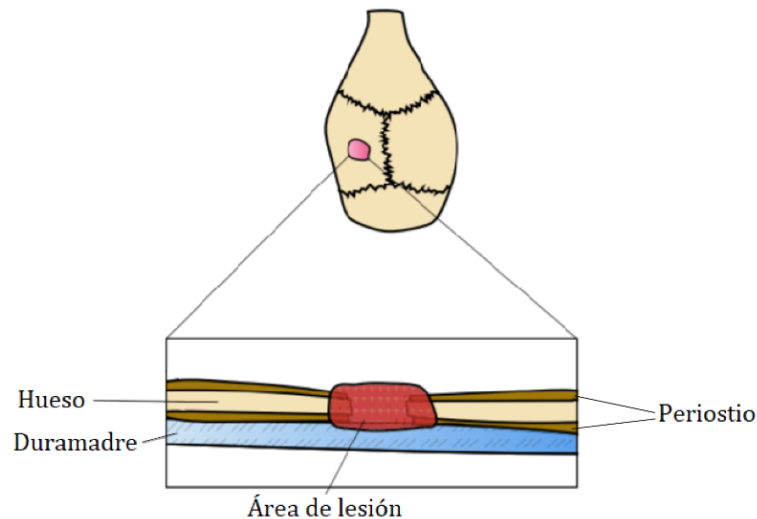


Imagen V.2. Modelo de defecto óseo en calota. Adaptado de McGovern [McGovern et al., 2018].

Una de las desventajas del modelo de calota es que no permite evaluar la capacidad del biomaterial en situaciones de carga mecánica. Por otro lado, los modelos en roedores no son útiles en estudios a largo plazo, en donde es necesario realizar múltiples biopsias o tomar muestras de sangre debido su corta esperanza de vida, poca superficie relativa de tejidos y bajos volúmenes sanguíneos en comparación con los humanos o animales más grandes. Además, cuando se trata de aplicaciones clínicas, estos modelos comienzan a fallar debido a que los roedores presentan un patrón de soporte de cargas distinto al humano. Sin embargo, y a pesar de estas desventajas, el modelo de calota resulta una buena primera aproximación para estudiar el comportamiento *in vivo* de un biomaterial con potencial aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo. Es por ello que en este trabajo de tesis se estudiaron tres *scaffolds*: pHEMA, HA y HA-E0.25 empleando este modelo de lesión ósea.

V.2 MATERIALES Y MÉTODOS

V.2.1 Reactivos y drogas

- Solventes: metanol (99.8%, Merck), alcohol etílico absoluto (99.5%, Biopack), xileno (98.5%, Biopack).
- Monómero: 2-hidroxietil metacrilato (HEMA, Sigma-Aldrich).
- Entrecruzante: Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA, Aldrich).
- Iniciador radicalario: azobisisobutironitrolo (AIBN, Merck).

V.2.2 Obtención de los *scaffolds*

Previamente a su uso, y para evitar posibles interferencias en las reacciones de síntesis, los diferentes reactivos fueron purificados. Para HEMA y EGDMA esto se realizó a través del pasaje por columna de alúmina neutra (Fluka), mientras que AIBN fue recristalizado desde metanol.

Debido a la disponibilidad del material, los hidrogeles semi-interpenetrados (sIPN) sintetizados en el presente trabajo de tesis, se obtuvieron empleando la muestra comercial purificada (ACP) como fuente de alginato de sodio.

La síntesis de los sIPN se llevó a cabo empleando HEMA como monómero, una solución 1% p/v de alginato de sodio, AIBN como iniciador radicalario y EGDMA como entrecruzante. Con el objetivo de evaluar si la incorporación de cambios en la composición de los reactivos produce diferentes propiedades en los materiales que, consecuentemente, pudieran afectar el comportamiento celular; se desarrollaron cinco membranas diferentes, cuyas proporciones se especifican en la Tabla V.1. El *scaffold* designado como pHEMA fue utilizado como condición control en la cual se empleó agua destilada en lugar de la solución de alginato.

Nombre	Relación HEMA/H ₂ O	Relación HEMA/ACP	EGDMA (%v/v) *	AIBN (%p/p) *
pHEMA	1:1	-	1	1
HA	-	1:1	1	1
HA-E0.5	-	1:1	0.5	1
HA-E0.25	-	1:1	0.25	1
HA-A0.5	-	1:1	1	0.5

Tabla V.1. Composición de hidrogeles sIPN. *Concentraciones con respecto al volumen de la solución de HEMA + ACP 1%.

Para ello, a la solución de alginato (o agua en el caso de pHEMA) se agregó el monómero HEMA por goteo en relación de volumen 1:1 y, una vez obtenida una solución homogénea, se adicionaron los reactivos restantes: EDGMA y AIBN. Una vez disuelto el iniciador, se procedió a remover el oxígeno de la mezcla de reacción mediante purga con nitrógeno gaseoso durante media hora en baño de hielo y cubierto de la luz. Luego, la mezcla se inyectó entre dos vidrios de 7x5 cm separados por un molde de teflón de 2 mm de espesor para obtener membranas rectangulares uniformes (Imagen V.3) y se llevó a una estufa (SanJor, modelo SL20C) a 60°C durante una hora. El material resultante fue removido del molde y lavado con agua destilada a ebullición durante 2 días. Luego las membranas se esterilizaron por autoclave durante 15 minutos a 1 atm y 121°C, y posteriormente se secaron por liofilización.

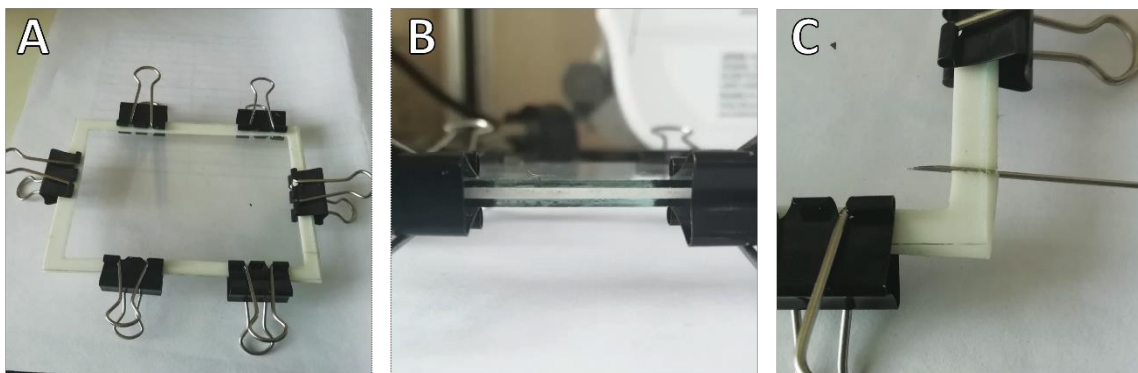


Imagen V.3. A) Moldes de reacción. B) Vista transversal del molde. C) Sitio de inyección de la mezcla de reacción.

V.2.3 Estudio de los *scaffolds*

V.2.3.1 Topografía y porosidad

La topografía de la superficie de los hidrogeles se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) luego de su metalización con oro en un equipo Philips 505 (The Netherlands) con una aceleración de voltaje de 20 kV. Las imágenes se analizaron con ADDAll (Soft Imaging System) y tanto el porcentaje de porosidad, así como la distribución del tamaño de poro, fueron medidos utilizando el software MBF ImageJ (NIH).

V.2.3.2 Estudio de hinchamiento

La capacidad de hinchamiento de los materiales se determinó durante un período de incubación de 30 días, según como se especificó previamente en la sección IV.2.4. Porciones de hidrogeles fueron pesadas (W_0) y posteriormente inmersas en agua destilada o en buffer fosfato salino (PBS) a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ a distintos tiempos (W_t). El contenido de agua o PBS absorbido por la membrana se calculó mediante la ecuación IV.2.

Se analizó el mecanismo por el cual ocurre el proceso de transporte de agua a través de las diferentes membranas (Ecuación V.1), utilizando los datos experimentales hasta un 25% del hinchamiento máximo para que la ecuación sea válida y así obtener el exponente de difusión, n [Ritger & Peppas, 1987].

$$\frac{W_t}{W_\infty} = k t^n \quad \text{Ecuación V.1}$$

En donde W_t y W_∞ representan la cantidad de agua absorbida al tiempo t y en el equilibrio, respectivamente. k es una constante propia del sistema que depende de las características estructurales del polímero y de las interacciones de éste con el solvente y n , es el exponente cuyo valor es indicativo del tipo de mecanismo mediante el cual se desarrolla el transporte del medio hacia la matriz polimérica.

V.2.3.3 Estudios de degradación

V.2.3.3.1 Degradación acelular

Luego de cada período de tiempo evaluado en la sección anterior, las muestras se lavaron exhaustivamente con agua destilada para remover las sales de PBS, se secaron por liofilización hasta peso constante y se pesaron (W_d) para calcular el porcentaje de pérdida de masa utilizando la ecuación IV.3. Para aquellos materiales incubados por más de 7 días, el medio (PBS o agua) fue renovado una vez por semana.

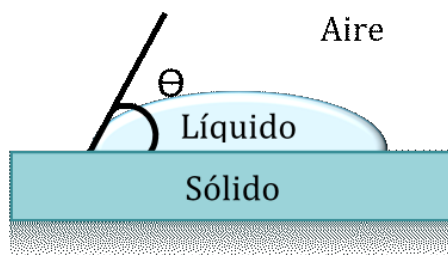
V.2.3.3.2 Degradación celular

De manera complementaria, se evaluó la degradación de las membranas a tiempos largos mediada por la acción de macrófagos RAW 264.7. Para ello se tomaron los hidrogeles previamente pesados (W_0) y se sumergieron en placas de cultivo de 48 pocillos en medio basal de cultivo durante 2 días. A posteriori de su hidratación, se plaquearon 2.5×10^4 células por pocillo y se cultivaron con DMEM suplementado con 1% de SFB. Luego de 7 y 15 días se realizó la lisis celular con tritón X-100 al 0.1% y las muestras se lavaron reiteradas veces con agua destilada para eliminar cualquier tipo de resto celular remanente. Finalmente, los materiales se secaron en un liofilizador hasta peso constante (W_d). En todos los casos se realizó la incubación a 37°C con una atmósfera humidificada con 5% CO₂ y se calculó el porcentaje de pérdida de peso según la ecuación IV.3.

V.2.3.4 Medidas de ángulo de contacto

Con el fin de caracterizar la superficie de las matrices poliméricas, se realizaron determinaciones de ángulo de contacto con agua en la interfaz sólido-aire a temperatura ambiente. La evaluación se realizó sobre los hidrogeles secos e hinchados durante 2 días en PBS. Para ello, se dejó caer una gota de agua destilada sobre las membranas y se usó una cámara fotográfica Nikon suplementada con un lente macro EF 50mm f/25 para capturar las imágenes de las gotas y así determinar los ángulos de contacto. Se realizaron al menos cinco determinaciones en diferentes posiciones sobre la superficie de cada muestra para calcular el ángulo de contacto estático medio. En el

Esquema V.1 se representa una gota de agua sobre un material sólido. Se observa la descomposición de fuerzas entre las distintas interfaces teniendo como resultante el ángulo θ conocido como ángulo de contacto.



Esquema V.1. Determinación del ángulo de contacto

V.2.3.5 Pruebas mecánicas

Se realizaron pruebas de tracción sobre los hidrogeles con el fin de evaluar sus propiedades mecánicas. Las mismas se determinaron con una máquina de ensayo universal (Digimess TC500) utilizando una celda de carga de fuerza ('Interface' de Arizona, EE.UU.) con capacidad de 50 N a temperatura ambiente. Luego de la incubación de las matrices durante 2 días en PBS, las mismas se cortaron en forma rectangular (50 x 18 mm) y se ensayaron a una velocidad de 5 mm/min hasta el punto de rotura. El módulo elástico (Módulo de Young) se calculó sobre la base de las curvas de tensión vs. deformación generadas con el equipo. Los resultados presentados son los valores promedios de 8 mediciones independientes.

V.2.4 Estudios de biocompatibilidad

Todos los procedimientos utilizados en el presente trabajo de tesis, que implican animales de experimentación, se llevaron a cabo de acuerdo con la guía de Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio [National Research Council, 2010], bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales - Disposición ANMAT 6677/10 - e internacionales - Código de Núremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones. Además, los protocolos de experimentación aquí descriptos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata (CICUAL, Protocolo Número 019-06-15).

Para la evaluación de la biocompatibilidad y posible versatilidad de los hidrogeles en distintos tejidos, se utilizaron tres tipos celulares: células progenitoras de médula ósea (CPMO), RAW 264.7 y condrocitos. El procedimiento para el cultivo de los dos primeros tipos de células fue descrito en el Capítulo III, mientras que el aislamiento y desarrollo del cultivo primario de condrocitos será detallado más adelante (sección V.2.4.1.1).

Los hidrogeles sIPN se cortaron con sacabocado de 8 mm de diámetro en su estado húmedo y luego se esterilizaron por autoclave a 1 atm y 121°C por 15 minutos. Para su utilización, fueron hidratados con 48 h de anticipación a la siembra de las células en PBS. Además, en todos los ensayos *in vitro* se utilizaron como control las células creciendo sobre las placas de cultivo estándar sin membrana bajo idénticas condiciones.

Los hidrogeles desarrollados presentaron una gran absorción y retención tanto del medio basal con rojo de fenol, como de los colorantes utilizados normalmente en nuestro grupo de trabajo para realizar pruebas colorimétricas. Por este motivo, y para evitar interferencias en las medidas, solo se realizaron aquellos estudios que implican el uso de extractos celulares, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), o la detección de productos metabólicos secretados por las células hacia el entorno acuoso y, en todos los casos, se realizaron incubaciones con DMEM sin rojo de fenol.

V.2.4.1 Cultivos celulares

V.2.4.1.1 Condrocitos

Para la obtención de un cultivo primario de condrocitos se aisló cartílago hialino del esternón de ratas Sprague-Dawley jóvenes. Para ello, se disecó la apófisis xifoides del esternón, se retiró el pericondrio y el cartílago; este último se cortó en pequeñas porciones con bisturí bajo condiciones de esterilidad; se lavó cinco veces con PBS con concentraciones crecientes de tripsina hasta 0.025% p/v, adaptando la metodología descrita por Qiu y colaboradores [Qiu et al., 2000]. Luego el cartílago se suspendió en medio basal, se depositó en frascos de cultivo celular de 25 cm², manteniéndolo en un incubador para cultivo celular a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂ con

medio de cultivo DMEM con 10% SFB. Cada tres días se renovó la mitad del medio de cultivo hasta la formación de una monocapa celular, aproximadamente 15 días. Luego se despegó usando tripsina 0.025% p/v en PBS / EDTA (1 mM), transfiriendo las células a frascos para cultivo celular de 75 cm² o a platos de cultivo multipocillos para realizar los diferentes ensayos, cultivando bajo las mismas condiciones basales.

V.2.4.2 Viabilidad celular

Para el estudio de viabilidad celular sobre los hidrogeles sIPN se utilizaron células CPMO, RAW 264.7 y condrocitos, que se mantuvieron en DMEM con 10% SFB a 37°C. La adhesión celular y la proliferación se evaluaron mediante el ensayo MTT, detallado en el apartado III.2.6.3. Para ello las células se cultivaron sobre los *scaffolds* en placas de cultivo de 48 pocillos durante 2 h (adhesión) o 48 h (proliferación). Después de estos períodos de cultivo, las células se incubaron durante 1 h adicional con una solución de 0.1 mg/mL de MTT. A continuación, los *scaffolds* se pasaron a un pocillo limpio, el sustrato degradado intracelular de formazán se disolvió con DMSO y la absorbancia se leyó a 570 nm. Los datos fueron expresados como porcentaje respecto del basal/área de superficie de sembrado, tomando como condición basal la cantidad de células adheridas en la superficie del pocillo control luego de transcurridas 2 h desde que se inició el ensayo. Cada pocillo en un plato de 48 tiene un área de 0.95 cm², mientras que todos los *scaffolds* utilizados en este trabajo de tesis presentan un área de 0.50 cm².

V.2.4.3 Evaluación de la capacidad osteogénica

La capacidad osteogénica se evaluó incubando las células CPMO sobre los hidrogeles en platos de 48 pocillos estériles con una densidad de 5x10⁴ células por pocillo en medio osteogénico sin rojo de fenol, usando pocillos sin hidrogeles como control, de igual modo que se detalló para el análisis del efecto de la purificación en los alginatos (apartado III.2.6.4). La actividad de fosfatasa alcalina (FAL) en las células crecidas y diferenciadas sobre los *scaffolds* luego de 15 días, se evaluó mediante la conversión de p-nitrofenilfosfato de sodio en p-nitrofenol descrita en el apartado III.2.6.4.1. De manera complementaria, se determinó la expresión de marcadores moleculares de diferenciación osteoblástica Runx2, colágeno tipo 1, FAL (Tabla V.2)

mediante la técnica semicuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Las metodologías empleadas se detallan a continuación.

V.2.4.3.1 Expresión de marcadores moleculares osteogénicos

Para los estudios de RT-PCR se aisló el ARN total de las células CPMO cultivadas sobre placas de 6 pocillos con y sin membrana en medio de diferenciación osteogénico durante 15 días mediante el método del reactivo TRIZOL (Invitrogen, Argentina), según lo sugerido por el fabricante. Se analizó la expresión de los marcadores osteogénicos (Runx2, fosfatasa alcalina (FAL) y colágeno tipo I (Colt1)) mediante la técnica semicuantitativa RT-PCR utilizando MMLV-RT (PB-L Productos Bio-Lógicos, Argentina), oligo dT (Biodinamics) y ADN polimerasa termoestable (Taq pegasus; PB-L Productos Bio-Lógicos, Argentina). El oligo dT funciona como cebador de la reacción para retrotranscribir ARN mensajero (ARNm) y así obtener ADN codificante. Para esta técnica se prosiguió según el protocolo indicado por el fabricante. Los primers específicos para los marcadores se diseñaron a partir de datos de secuencia del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el software CLC Genomics Workbench (QIAGEN) (Tabla V.2). La temperatura de alineamiento (T_a) para cada par de primers se calculó usando el software disponible en www.appliedbiosystems.com. Luego los productos de la RT-PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 2% p/v en buffer TAE (0.5% p/v Tris (Sigma-Aldrich, Bs. As., Arg.), 0.1% v/v ácido acético glacial y 0.001 M de EDTA, pH 8) con bromuro de etidio (BrEt) como colorante de visualización. El gel se corrió a 150 V durante 20 minutos y la cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó utilizando la herramienta de análisis de geles del programa MBF ImageJ. Los resultados se expresan como intensidad relativa y representan el cociente entre la intensidad de señal de la banda específica de cada marcador evaluado y la intensidad de señal de β -actina como proteína constitutiva (*housekeeping*).

Marcador	Código Genbank	Tamaño del producto (pb)	Secuencia	Ta (°C)
<i>β-actina</i>	NM_031144.3	345	fw CCTTCAACACCCAGCCAT rv CATAGCTCTTCTCCAGGGA	56.1
<i>Runx2</i>	XM_006244554.2	598	fw GGGGCAGAAAGGAGAACCT rv TTGCATGACTCCCATCTGG	55.1
<i>FAL</i>	J03572.1	737	fw GACAGCAAGCCCAAGAGA rv CAGTTCAGTGCGGTTCCA	55.1
<i>Colt1</i>	NM_053304.1	651	fw GCATACACAATGGCCTAA rv CTGTTCCAGGCAATCCAC	51.8

Tabla V.2. Primers marcadores osteogénicos

V.2.4.4 Evaluación de la capacidad condrogénica

Para evaluar la capacidad condrogénica de los hidrogeles sIPN se utilizaron los condrocitos primarios aislados como se indicó previamente. Los condrocitos se cultivaron sobre placas de 48 pocillos con y sin la membrana polimérica hasta confluencia y se mantuvieron en medio basal durante 10 días a 37°C en 5% de CO₂ y atmósfera húmeda para estudiar la expresión de marcadores condrogénicos (Tabla V.3) moleculares mediante RT-PCR, detalladas a continuación.

V.2.4.4.1 Expresión de marcadores moleculares condrogénicos

Para el análisis de los marcadores moleculares condrogénicos, mediante la técnica de RT-PCR, se aisló el ARNm de los condrocitos cultivados durante 10 días con medio basal, y se trató de igual modo que para la evaluación de los marcadores osteogénicos detallada previamente. Se analizó la expresión de los marcadores condrogénicos (colágeno tipo II (Colt2), agregán y SOX9) y el marcador no-condrogénico colágeno tipo 1 (Colt1), que fueron normalizados utilizando β-actina como *housekeeping*. Los *primers* específicos para los marcadores condrogénicos se diseñaron a partir de datos de secuencia del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Tabla V.3).

Marcador	Código Genbank	Tamaño del producto (pb)	Secuencia	Ta (°C)
<i>β-actina</i>	NM_031144.3	345	fw CCTTCAACACCCCAGCCAT rv CATAGCTCTTCTCCAGGGA	56.1
<i>Colt2</i>	NM_012929.1	295	fw GGGGCAGAAAGGAGAACCT rv TTGCATGACTCCCATCTGG	57.2
<i>Colt1</i>	NM_053304.1	651	fw GCATACACAATGGCCTAA rv CTGTTCCAGGCAATCCAC	51.8
<i>Agregación</i>	NM_022190.1	525	fw CCATCCCCTGCTACTTCATC rv CACCATAGCAACCTTCCC	54.5
<i>SOX9</i>	NM_080403.1	503	fw TCTCCTGGACCCCTTCAT rv GGTGGTCTTTCTTGCT	52.3

Tabla V.3. *Primers* marcadores condrogénicos

V.2.4.5 Evaluación de citotoxicidad

Para determinar la eventual citotoxicidad de los *scaffolds* se evaluó la producción de óxido nítrico (NO) utilizando los macrófagos RAW 264.7, de modo similar que en el caso de la evaluación de los distintos alginatos (apartado III.2.6.5). Brevemente, los macrófagos se cultivaron sobre los hidrogeles o pocillos sin membrana (condición control) con DMEM sin rojo de fenol y SFB al 5% en placas de 48 pocillos. Luego de 48 h se recogieron los sobrenadantes y se evaluó la producción de NO mediante el ensayo de Griess.

V.2.5 Estudios de caracterización *in vivo*: modelo de lesión ósea

V.2.5.1 Animales

La evaluación de los hidrogeles se realizó empleando nueve ratas macho de la cepa WKAH/Hok de tres meses de edad que fueron distribuidas al azar en tres grupos. Previo a su uso, las ratas se aclimataron durante 15 días en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. A su vez, antes y después de la cirugía se las mantuvo alimentadas con una dieta estándar y agua ad libitum en una jaula ubicada en una sala aislada del bioterio con control de temperatura y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Todos los procedimientos detallados anteriormente se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicados por los Institutos Nacionales de Salud, y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de

Laboratorio de esta Facultad (Protocolo Número 019-06-15, CICUAL, Fac. Cs. Exactas, UNLP).

V.2.5.2 Modelo de regeneración ósea

Para realizar un defecto de craneotomía en cada hueso parietal de los animales [Molinuevo et al., 2010] se utilizaron técnicas asépticas estándar. En primer lugar, se indujo anestesia general mediante inyección intraperitoneal de 0.2 mL cada 100 g de peso corporal de hidrocloreto de ketamina (Ketamine®, Brouwer, 50 mg/mL) y otra intramuscular de 0.2 mL cada 100 g de peso corporal de clorhidrato de xilazina (kensol®, König, 20 mg/mL). Luego de la restauración y preparación de la región frontoparietal, se realizó una incisión de 15 mm de largo para exponer el hueso sobre la sutura interparietal. Con el fin de eliminar el periostio de la zona, se raspó con la hoja de un bisturí la superficie del cráneo, manteniendo intacta la duramadre subyacente. Se realizaron dos defectos de craneotomía circular de 2 mm de diámetro a cada uno de los animales, uno en cada parietal, mediante un torno manual de baja velocidad con irrigación constante de solución fisiológica estéril, procurando mantener la integridad de la duramadre y el cerebro durante su desarrollo. En cada animal se colocó el hidrogel a estudiar en uno de los defectos, manteniendo el otro vacío como control (Imagen V.4, la flecha amarilla señala el *scaffold*).

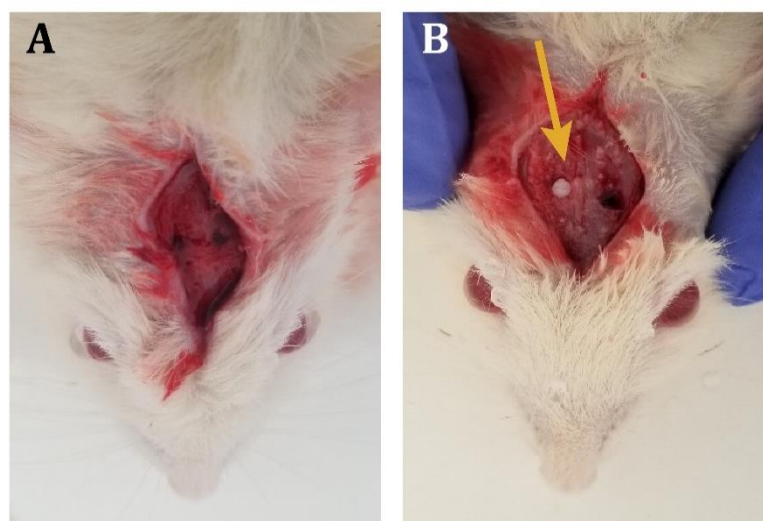


Imagen V.4. Craneotomía A) antes y B) después de colocar el hidrogel.

Las heridas se suturaron con hilo de nylon monofilamento de color azul de calibre usp 5-0 (Supralon, Cardiopack Argentina S.A.). Luego de la sutura y durante los días posteriores se utilizó lidocaína clorhidrato 10% en spray (Indican®, SIDUS S.A.) como anestésico. Los animales se sacrificaron treinta días después de la cirugía, bajo anestesia con xilazina y ketamina, por dislocación cervical. Las muestras de las calotas de cada animal se recolectaron para los estudios histomorfométricos.

V.2.5.3 Estudio histomorfométrico

V.2.5.3.1 Obtención de cortes histológicos

Con el objetivo final de obtener cortes histológicos para evaluar el efecto de los hidrogeles en herida de calota de rata, posteriormente al sacrificio, los huesos parietales se fijaron en buffer de formalina neutra (NBF) durante 72 horas y luego se descalcificaron con una solución al 10% de EDTA (Biopack, Buenos Aires, Argentina) durante 90 días a temperatura ambiente. A continuación, se utilizaron solventes con distinto grado de polaridad para deshidratar los huesos. Este proceso se inició con dos pasajes sucesivos de 1 h en soluciones de alcohol con grado decreciente de hidratación (70 °, 96 ° y 100 °), xileno y finalmente en parafina I y parafina II fundidas a 56 °C para su inclusión. Los huesos incluidos en parafina se cortaron en secciones semi-seriadas de 6 µm en dirección anteroposterior con un micrótopo SM 2000R Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los cortes se recogieron en un baño termostático de flotación y se secaron durante toda la noche a 56°C en estufa (SanJor, Buenos Aires, Argentina), finalmente, los mismos se procesaron para su análisis histológico y morfométrico.

V.2.5.3.2 Coloración histológica

Los cortes histológicos se sumergieron en xileno para eliminar la parafina, luego se rehidrataron usando el tren de hidratación (alcoholes con grado creciente de hidratación: 100°, 96° y 70°), y a continuación se realizaron coloraciones de Hematoxilina – Eosina (H & E) y Picrosirius Red.

V.2.5.3.2.1 Hematoxilina y Eosina (H & E)

La hematoxilina es un colorante básico que tiñe las estructuras ácidas (basófilas) en tono violáceo como, por ejemplo, los núcleos celulares. Por su parte la eosina, colorante con naturaleza ácida, tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, como la mayoría de las proteínas al pH de la tinción. Para la coloración, los cortes hidratados, se tiñeron 3 minutos con Hematoxilina (Biopur, Argentina), se lavaron con agua corriente y se sumergieron 1 minuto en Eosina (Biopur, Argentina). Finalmente, se enjuagaron con agua destilada, se deshidrataron utilizando un tren de deshidratación (alcohol 70°, 96°, 100°, xileno) y se montaron con bálsamo sintético (Biopur, Argentina).

V.2.5.3.2.2 Picosirus Red

La tinción de Picosirus Red resulta un método simple para identificar redes de fibras de colágeno en tejidos. Sirius Red es un colorante aniónico con seis grupos sulfonato que pueden asociarse a las fibras de colágeno catiónicas, con capacidad de intensificar su birrefringencia bajo luz polarizada. Para la coloración, los cortes hidratados fueron fijados con solución de Bouin durante 30 minutos, se lavaron con agua destilada y se sumergieron 30 minutos en Sirius Red (o Direct Red 80, Sigma). Posteriormente, los cortes fueron lavados con HCl 0.01 N para quitar el exceso de colorante y se deshidrataron utilizando el tren de deshidratación. Finalmente se montaron con bálsamo sintético y observaron al microscopio óptico con y sin luz polarizada.

V.2.5.3.3 Histomorfometría ósea

Las fotografías de los cortes para este estudio se tomaron con una cámara CCD con lente Nikon 0.7x DMX en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokio, Japón). Las mismas se analizaron con el programa Image J (www.macbiophotonics.ca/imagej) ajustando con un plugin de escala de microscopio. Las mediciones se realizaron sobre los cortes, a partir de las fotografías, contorneando el área de hueso nuevo (reosificado Imagen V.5, línea celeste) y el área del tejido conjuntivo formado (línea negra). Para un mismo tipo de tejido (hueso nuevo o conjuntivo), se tuvo en cuenta la sumatoria de las distintas secciones alrededor de todo el sitio de lesión. Los valores obtenidos se

expresaron en función del área total del defecto óseo cuando el diámetro de la herida alcanzó su máximo (2 mm) (Imagen V.5, línea amarilla).

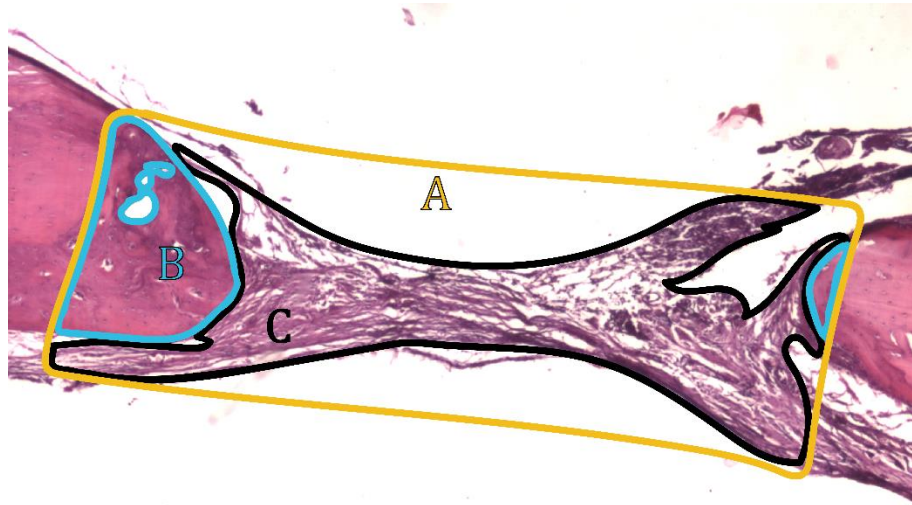


Imagen V.5. Micrografía del corte del defecto sin rellenar. A) Amarillo: área total del defecto. B) Celeste: área de reosificación. C) Negro: área de relleno de tejido conectivo.

La reosificación del hueso después de 30 días poscirugía se calculó como:

$$\text{reosificación (\%)} = \frac{\text{área de hueso reosificado } (\mu\text{m}^2)}{\text{área del defecto óseo } (\mu\text{m}^2)} \times 100 \quad \text{Ecuación V.2}$$

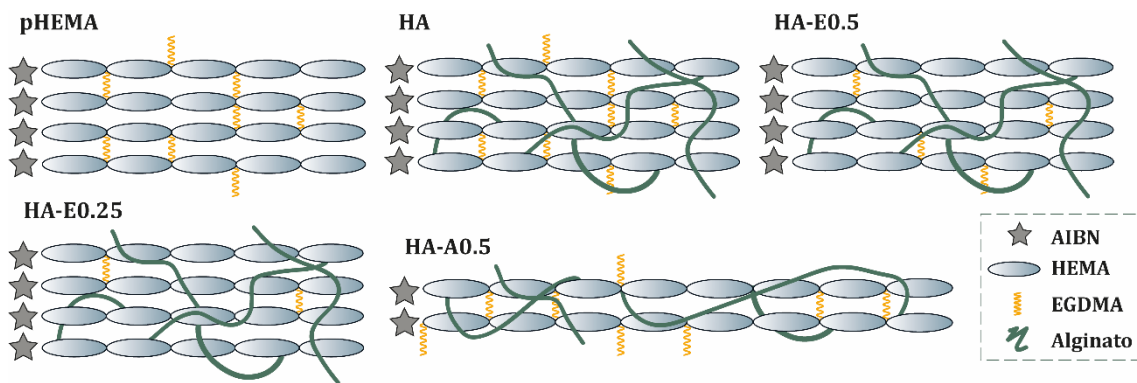
$$\text{tejido conectivo (\%)} = \frac{\text{área de tejido conectivo } (\mu\text{m}^2)}{\text{área del defecto óseo } (\mu\text{m}^2)} \times 100 \quad \text{Ecuación V.3}$$

V.2.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y, a menos que se indique lo contrario, se obtuvieron a partir de al menos dos experimentos separados realizados por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey con el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ para todos los análisis estadísticos.

V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Esquema V.2 muestra una representación esquemática de los modelos planteados para las sIPN sintetizadas en este trabajo de tesis basados en la composición inicial de sus reactivos constituyentes y sus variaciones. El esquema representado por pHEMA corresponde a las proporciones de monómero, entrecruzante e iniciador volcadas en la Tabla V.1. A su vez, HA incorporaría alginato a una red polimérica idéntica a pHEMA de manera semi-interpenetrada. HA-E0.5 y HA-E0.25 fueron formuladas con un 50% y un 25% menos de entrecruzante que el primer hidrogel, lo cual implicaría una disminución de los puntos de entrecruzamiento en la red polimérica, proporcional a las concentraciones del reactivo, lo cual aumentaría la elasticidad de las cadenas. Por último, la síntesis de HA-A0.5, se realizó empleando un 50% de la concentración de iniciador con respecto a pHEMA, pero con idénticas proporciones de monómero y entrecruzante. Esto implicaría una disminución en la cantidad de especies reactivas disponibles para iniciar la polimerización, lo que generaría que cada centro reactivo produzca cadenas poliméricas de mayor peso molecular.



Esquema V.2. Representación de hidrogeles sIPN.

Puede apreciarse de la evaluación macroscópica que pHEMA (Imagen V.6 A) presenta una superficie homogénea y completamente transparente, mientras que el agregado de alginato en los hidrogeles restantes les otorgó una apariencia blanca y opaca (Imagen V.6 B), sin heterogeneidad aparente.

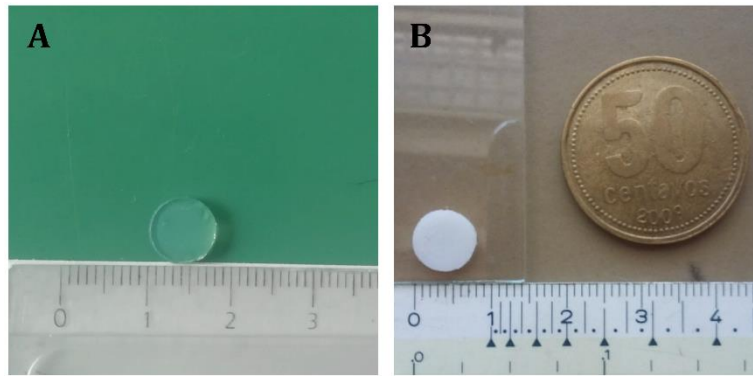


Imagen V.6. Imágenes de las membranas obtenidas luego del proceso de purificación. A) pHEMA y B) HA, también representativa de HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.5.

V.3.1 Estudio de los *scaffolds*

V.3.1.1 Morfología y porosidad

Con el fin de evaluar el efecto del agregado de alginato y/o del cambio en la composición de la mezcla de reacción en la morfología de los hidrogeles, se estudió la superficie de estos a través de imágenes obtenidas por SEM.

En la Imagen V.7 puede observarse que pHEMA presenta una superficie lisa. Por el contrario, los hidrogeles a los que se les incorporó alginato en la mezcla de reacción mostraron una superficie porosa. La Tabla V.4 muestra la porosidad de la superficie y el tamaño de poro promedio, en donde HA y HA-A0.5 presentan valores superiores al resto de las matrices en ambos parámetros. Aunque no se utilizó ningún tipo de síntesis clásica para la creación de superficies porosas; tal como liofilización, electrospinning ó espumado por gas; el método de síntesis utilizado en este trabajo produjo materiales con nanoporos y con un bajo porcentaje de porosidad [Sornkamnerd et al., 2017]. Se ha demostrado previamente que las estructuras porosas son fundamentales para la angiogénesis [Annabi et al., 2010]. Loh y colaboradores describieron que el tamaño de radio de poro mínimo necesario para la generación de vasos sanguíneos es de alrededor de 200 μm [Loh & Choong, 2013]. Aunque el tamaño de poro obtenido en nuestros hidrogeles es 1000 veces menor al necesario para la angiogénesis, esto podría ser beneficioso, ya que el cartílago es un tejido no vascularizado que, cuando es invadido por vasos sanguíneos, puede provocar hipertrofia y calcificación [Pelttari et al., 2006].

Por otro lado, con respecto al tejido óseo, aún no se encuentran del todo claros los criterios de diseño para *scaffolds* que colaboren en la reparación de hueso. En general, se ha estipulado que los materiales deben imitar la morfología, estructura y función del hueso para optimizar la integración con los tejidos circundantes [Hutmacher, 2000; Karageorgiou & Kaplan, 2005]. Sin embargo, es tal la variabilidad en la arquitectura y las propiedades mecánicas del hueso; en donde entran en juego parámetros como la edad, estado nutricional, actividad y estado de salud de los individuos; que resulta un verdadero reto encontrar un diseño único de *scaffold* para defectos específicos [Fratzl et al., 2004]. A su vez, el hueso se clasifica en dos tipos: trabecular y cortical, siendo el primero el principal modelo para el diseño de materiales porosos. Mientras que el hueso cortical, también llamado compacto es esencialmente un material denso con poco espacio interno vacío con un rango de porosidad que va de 5 al 10%, más similar a la estructura observada en las imágenes.

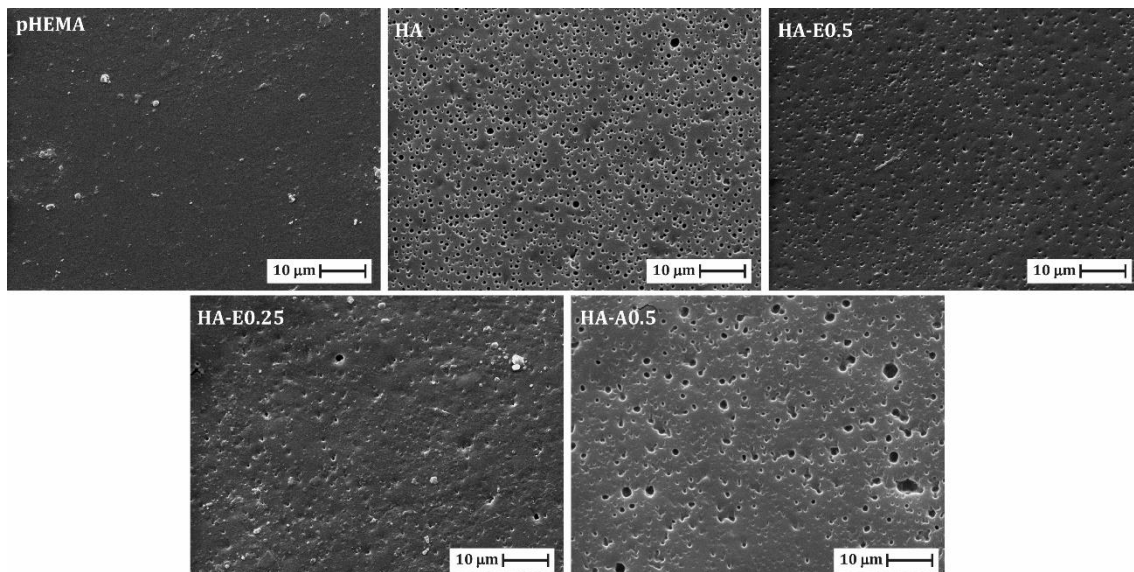


Imagen V.7. Imágenes de SEM de los hidrogeles con una magnificación de 1000. Las barras de escalas corresponden a 10 µm.

<i>Nombre</i>	Porosidad (%)	Tamaño de poro (nm)
<i>pHEMA</i>	SD	SD
<i>HA</i>	12.00 ± 0.07	312.7 ± 6.9
<i>HA-E0.5</i>	1.98 ± 0.03 b	199.6 ± 7.1 b
<i>HA-E0.25</i>	0.56 ± 0.07 b,c	129.4 ± 10.3 b,c
<i>HA-A0.5</i>	13.83 ± 0.19 c,d	310.2 ± 9.1 c,d

Tabla V.4. Porcentaje de porosidad y tamaño de poro para los diferentes hidrogeles. b: $p < 0.01$ vs. HA; c: $p < 0.01$ vs. HA-E0.5; d: $p < 0.01$ vs. HA-E0.25.

V.3.1.2 Estudio de hinchamiento

La difusión de oxígeno y nutrientes es fundamental para la viabilidad celular y el correcto desarrollo de los tejidos en etapas regenerativas. Por este motivo, en este trabajo de tesis se estudió la capacidad de hinchamiento de los materiales sintetizados.

En la literatura existen numerosos estudios en los que se evaluó la capacidad de hinchamiento de hidrogeles en agua. Sin embargo, debido a que el objetivo principal de los materiales obtenidos en este trabajo de tesis se enfoca en su aplicación en regeneración de tejidos, resulta más adecuado realizar también los ensayos de hinchamiento en condiciones isotónicas, tal como buffer fosfato salino (PBS).

La Figura V.1 muestra el hinchamiento de los materiales en PBS y agua luego de diferentes períodos de tiempo. En la Tabla V.5 se observa el hinchamiento final de cada hidrogel luego de 720 h (30 días) en PBS. Del análisis de los datos presentados en la tabla mencionada, se puede observar para el estudio de hinchamiento en PBS, un aumento en la captación de líquido por parte de HA al compararlo con pHEMA ($p < 0.01$). La introducción de un polímero hidrofílico como el alginato a una red polimérica favorece sus propiedades de absorción de agua. Además, este polisacárido provoca fuerzas electrostáticas repulsivas en la red debido a las cargas negativas de los grupos funcionales carboxilato, lo que provoca un ensanchamiento del espacio entre las cadenas poliméricas que favorece el hinchamiento. Por otra parte, se observó un aumento en la capacidad de captación de PBS de HA tanto con respecto a HA-E0.5 como

a HA-E0.25 ($p < 0.01$). Resultados similares fueron reportados por Mohan y colaboradores [Mohan et al., 2005], quienes sintetizaron redes poliméricas de un copolímero de acrilamida y metacrilato de sodio entrecruzado con EGDMA. Ellos observaron que la capacidad de hinchamiento de los materiales era directamente proporcional a la cantidad de entrecruzante utilizado cuando este se encontraba en el rango de 5.04×10^{-5} - 7.05×10^{-4} moles en 2 mL de volumen final de la mezcla de reacción. Por el contrario, por encima de este valor observaron una disminución en la capacidad de captación de líquido por parte del material. A su vez, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el hinchamiento de HA-E0.5 y HA-E0.25. Finalmente, la Figura V.1 A muestra una disminución en la captación de líquido de HA-A0.5 con respecto a HA ($p < 0.01$). Mandal [Mandal & Ray, 2013] obtuvo resultados equivalentes al evaluar el hinchamiento de hidrogeles de poli(acido acrílico-co-hidroxietilmetacrilato) semi-interpenetrados con alginato de sodio, ya que al aumentar la concentración de iniciador de 0.5 a 1.5% también incrementó el porcentaje de captación de agua. Esto podría deberse a que, con el aumento de la concentración de iniciador, se producen cadenas poliméricas de menor peso molecular que pueden llevar a la formación de redes imperfectas con mayor porcentaje de incorporación de líquido. Así, al ordenar los hidrogeles de acuerdo a su capacidad de hinchamiento, se obtiene que HA-A0.5 < pHEMA < HA-E0.5=HA-E0.25 < HA.

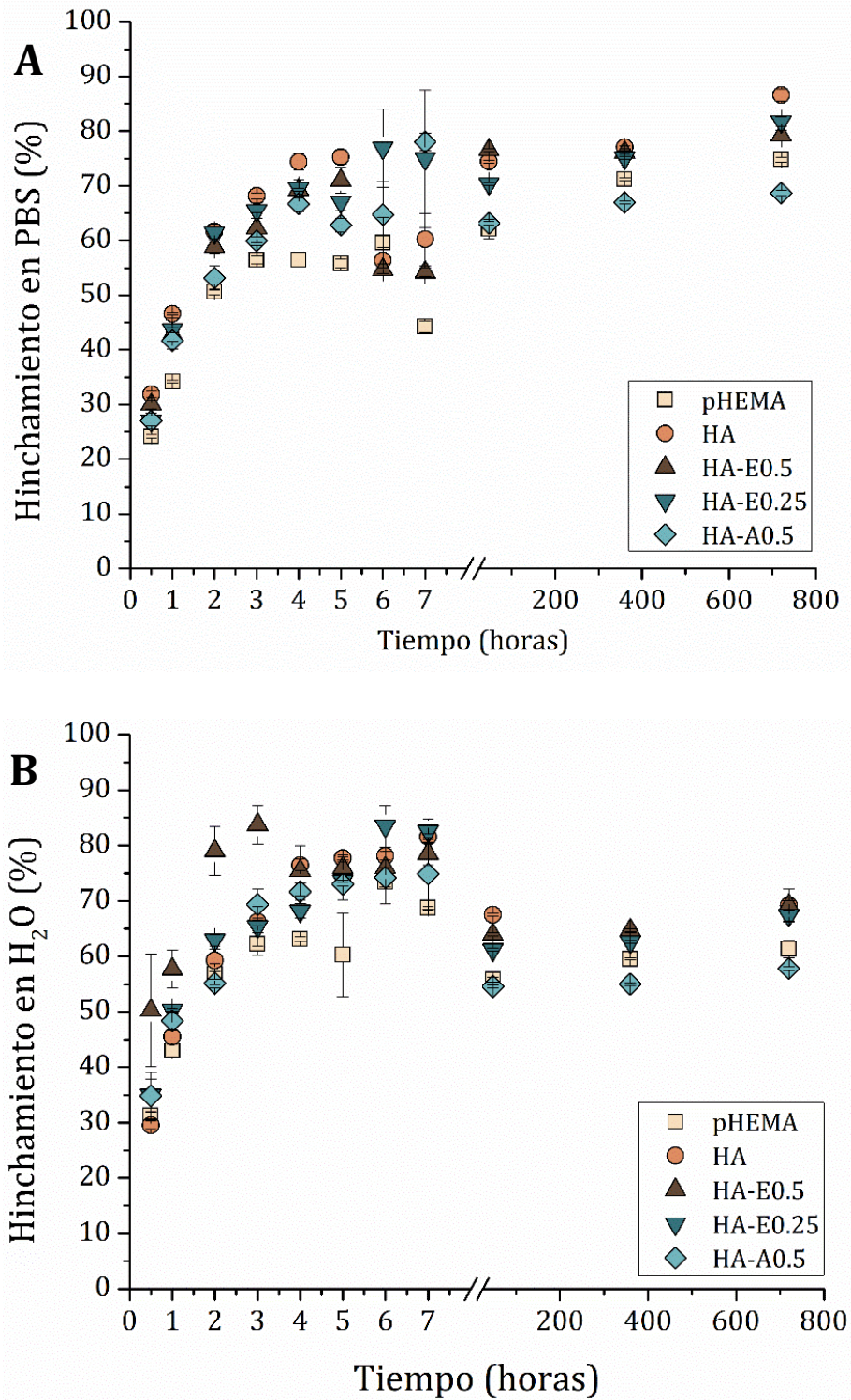


Figura V.1. Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles en A) PBS y B) agua durante 720 h.

Al observar los resultados del porcentaje final de hinchamiento en agua (Tabla V.5) los hidrogeles pueden ser ordenados de manera similar a aquellos incubados en PBS, con la única diferencia de que no se encontraron diferencias significativas en la captación de agua para HA, HA-E0.5 y HA-E0.25. A su vez, los materiales estudiados en

agua mostraron un porcentaje final de absorción menor para el mismo período de tiempo. En principio, cambios en el comportamiento del hinchamiento de los hidrogeles debido a la presencia de sales puede estar dada por efectos electrostáticos, la estructuración de las moléculas de agua en la red polimérica (las sales pueden ordenar estructuras o desordenarlas) o a la formación de complejos entre el polímero y los iones. Además, otro efecto significativo de la concentración de sales puede estar dado por la presión osmótica del sistema de hinchamiento, que resulta de la diferencia de concentración entre los iones del interior del gel y los de la solución en la que se encuentra embebido [Dušek et al., 1977]. En el caso particular planteado en esta tesis, una posible explicación al aumento de la captación de líquido por parte de los hidrogeles sumergidos en PBS con respecto a aquellos evaluados en agua, puede deberse a que las concentraciones de iones favorecen la repulsión entre las cadenas de alginato, produciendo la expansión de la red. También, la naturaleza aniónica del polisacárido puede producir una reducción en el carácter hidrofóbico de la cadena polimérica y, además, puede generar la atracción electrostática de cationes que favorezca el aumento de la presión osmótica en el interior del hidrogel, fomentando el incremento en la absorción de líquido [Bajpai & Shrivastava, 2002].

En este contexto, se demuestra que para lograr mejores predicciones *in vivo* a partir de extrapolaciones de resultados *in vitro*, no resulta suficiente conocer el hinchamiento de los biomateriales en agua. Estudios de este tipo deben ser realizados en condiciones que se asemejen, en la mayor medida posible, al entorno fisiológico.

Nombre	PBS		H ₂ O	
	<i>n</i>	Hinchamiento (%) 720 h	<i>n</i>	Hinchamiento (%) 720 h
<i>p</i> HEMA	0.38	74.8 ± 0.5	0.33	61.3 ± 1.6
HA	0.33	86.6 ± 1.1 a	0.32	69.2 ± 0.8 a
HA-E0.5	0.38	79.2 ± 1.0 a, b	0.36	69.2 ± 2.9 a
HA-E0.25	0.34	81.7 ± 0.9 a, b	0.37	67.4 ± 1.0 a
HA-A0.5	0.29	68.7 ± 0.5 a, b, c, d	0.38	57.8 ± 0.4 b, c, d

Tabla V.5. Porcentaje de hinchamiento a 720 h (30 días) y exponente *n* de los hidrogeles en PBS y agua. a: $p < 0.01$ vs. *p*HEMA; b: $p < 0.01$ vs. HA; c: $p < 0.01$ vs. HA-E0.5; d: $p < 0.01$ vs. HA-E0.25.

Además, entre las 5-7 h, los *scaffolds* *p*HEMA, HA y HA-E0.5 mostraron un comportamiento de hinchamiento denominado “efecto *overshooting*” cuando fueron incubados en PBS (Figura V.2). Este fenómeno consiste en una primera etapa donde el hidrogel se hincha hasta alcanzar un valor máximo, el cual es seguido de una segunda etapa de deshinchamiento gradual hasta alcanzar una condición de equilibrio. Para el caso de los hidrogeles incubados en agua, este comportamiento se encuentra desplazado hacia períodos de tiempo mayores, que van desde las 8 a 48 h (Figura V.1) y, además, se observó para todos los materiales. La causa de este efecto aún no está esclarecida, pero podría deberse a una combinación de factores como la polaridad, fuerza iónica o mecanismo de difusión del medio de hinchamiento, así como el grado de relajación de la cadena del polímero o de la presencia de un entrecruzamiento iónico-covalente [Anbinder et al., 2016; Yin et al., 2008].

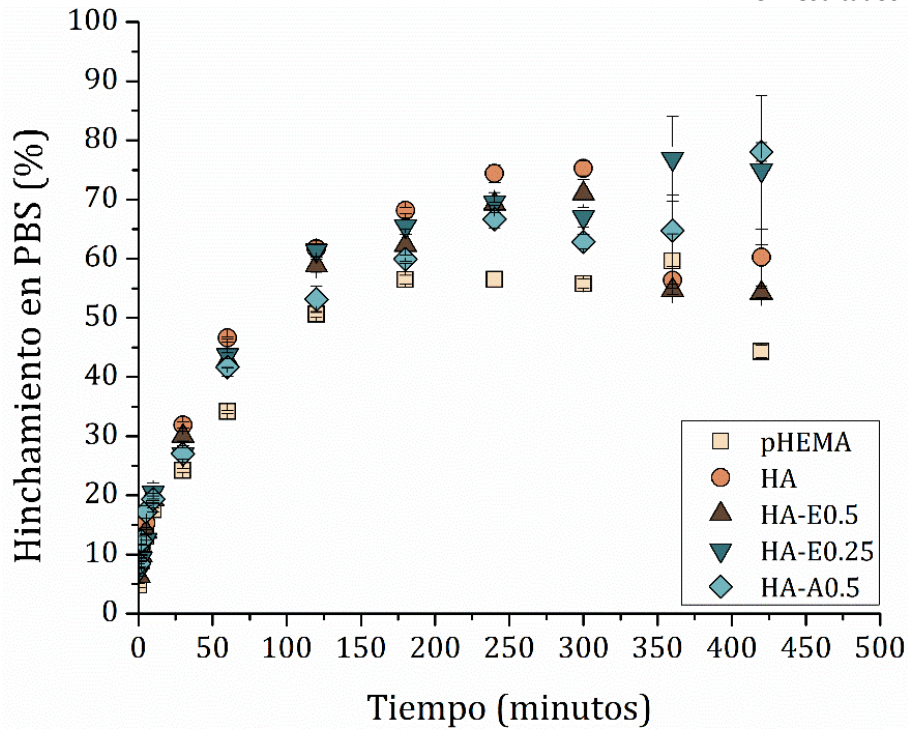


Figura V.2. Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles en PBS durante 7 h (420 minutos).

Para conocer el mecanismo de hinchamiento de los hidrogeles, se calculó el exponente n a partir de la aplicación de la función logarítmica en la Ecuación V.1. En la Tabla V.5 se puede observar que, para todos los casos, se obtuvo un valor de $n < 0.5$. En este sentido, el mecanismo de difusión del solvente de los hidrogeles sintetizados se encuentra regido por un proceso denominado “Menos Fickiano”. En este caso, el grado de penetración del solvente en el material es mucho menor que el grado de relajación de las cadenas poliméricas [Bajpai et al., 2002]. Podría pensarse que este comportamiento se debe a la fuerza iónica del solvente, sin embargo, al evaluar el hinchamiento de los hidrogeles en agua se obtuvo nuevamente un valor de $n < 0.5$. Algunos autores han reportado hidrogeles con un valor del exponente de $n < 0.5$, entre ellos Wang y colaboradores [Wang et al., 2008], que coincidentemente sintetizaron hidrogeles usando HEMA y estireno, observando un comportamiento “Menos Fickiano” al evaluar su hinchamiento en agua. Además, de acuerdo con sus resultados, el material obtenido utilizando solo HEMA como monómero presentó un porcentaje de hinchamiento similar al encontrado en este trabajo de tesis a pesar de las diferencias en el proceso de síntesis.

Es posible llevar a cabo un análisis matemático más exhaustivo para conocer de manera más profunda el mecanismo de difusión del solvente al interior de cada hidrogel. Sin embargo, esto excede los objetivos del presente trabajo, que es conocer la capacidad de hinchamiento del material para ser extrapolado en sistemas *in vivo*.

3.1.3 Estudios de degradación

Una vez que los hidrogeles son implantados en el sitio de lesión, es importante que estos sean degradados a medida que el nuevo tejido se regenera. *In vivo*, se llevan a cabo varios mecanismos con el fin de degradar el material, los más comunes son: agua, sales (aniones y cationes), pH del medio fisiológico y agentes enzimáticos [Sabino et al., 2004; Wissing et al., 2019]. La hidrólisis es un proceso degradativo de los polímeros en los cuales se rompen enlaces covalentes en presencia de ácidos o álcalis, mientras que la degradación mediada por macrófagos involucra la secreción de enzimas hidrolíticas que contribuyen a la pérdida de masa. La degradación de los hidrogeles fue evaluada en agua o en PBS (30 días, mecanismo hidrolítico acelular), o con macrófagos RAW 264.7 (15 días). En la Figura V.3, se puede observar el porcentaje de pérdida de masa de los hidrogeles.

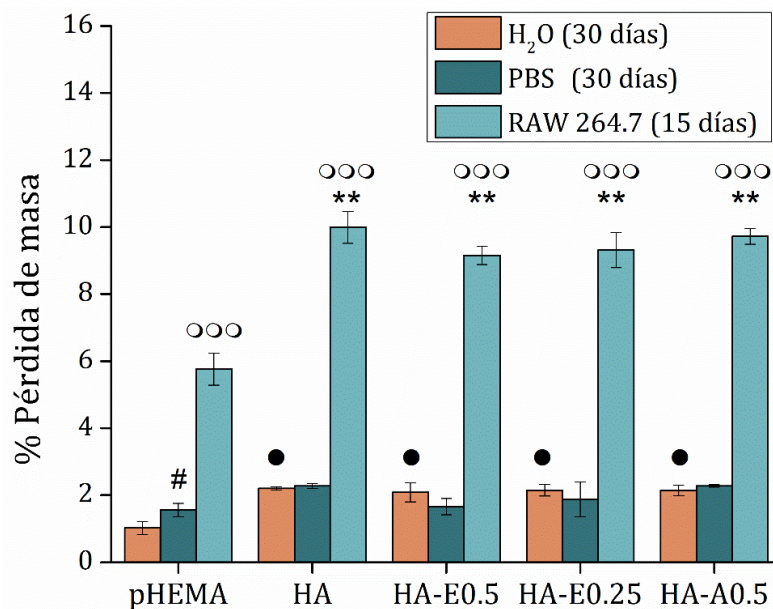


Figura V.3. % Pérdida de masa de los hidrogeles luego de degradación en agua y PBS por 30 días, y por macrófagos RAW 264.7 luego de 15 días. #: $p < 0.05$ vs pHEMA en H₂O; ●: $p < 0.05$ vs pHEMA en H₂O; **: $p < 0.01$ vs pHEMA con RAW 264.7; ○○○: $p < 0.001$ vs misma condición en H₂O y PBS.

Cuando el estudio se llevó a cabo en agua, se pudo observar un aumento significativo ($p < 0.05$) de la degradación de los hidrogeles con incorporación de alginato cuando estos son comparados con pHEMA, pero no se observaron diferencias cuando se realizó la evaluación en PBS. Por otro lado, la degradación por macrófagos luego de 15 días de incubación fue mayor que en la degradación hidrolítica, tanto en agua como en PBS luego de 30 días ($p < 0.001$). Además, se puede observar una pérdida de masa mayor en los hidrogeles con alginato que en pHEMA ($p < 0.01$). Estos resultados están en concordancia con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en los que se evaluó la degradación de dos hidrogeles sintetizados con policaprolactona conteniendo poli (2-hidroxietil acrilato). En esos estudios se observó un porcentaje bajo de pérdida de masa, al incubar los materiales en PBS luego de 30 días. Sin embargo, la degradación aumentó significativamente luego de 15 días de exposición al cultivo con macrófagos RAW 264.7 [Fernández et al., 2010]. De manera similar, Mabileau y colaboradores estudiaron la degradación de materiales de pHEMA-EGDMA por la línea celular de macrófagos J774.2, observando que las células producían la degradación del material a través de un proceso de erosión superficial [Mabileau et al., 2004]. Una de las mayores desventajas de la utilización de HEMA como monómero para la síntesis de sustitutos biológicos es su baja degradabilidad [Barui, 2018]. Sin embargo, tal y como se demuestra en esta sección, encontramos que la incorporación de alginato induce un aumento significativo en la degradación mediada por macrófagos en todos los hidrogeles que lo contienen. Este mismo efecto puede observarse también en agua, más no en PBS, y esto podría deberse las variaciones existentes en el pH de ambos: el agua destilada tiene un pH de aproximadamente 5.6, lo que genera un entorno ácido en cual el alginato resulta más sensible a la hidrólisis; mientras que PBS tiene un pH de 7.4, valor en el cual el polisacárido es más estable [Arvizu Higuera, 1993].

A pesar de estos resultados, es necesario siempre recordar las limitaciones del modelo experimental basadas en las diferencias entre un sistema de degradación *in vivo* (donde hay procesos fisiológicos complejos y multicelulares) con un sistema de degradación *in vitro* y, mucho más aún, con un sistema de degradación acelular.

Como puede observarse en la Figura V.1 de la sección V.3.1.2, el máximo de hinchamiento de los hidrogeles se logró luego de 2 días de incubación en PBS sin

degradación apreciable. Luego de este período de tiempo, se alcanzó el equilibrio. Es por este motivo que las medidas de ángulo de contacto, pruebas mecánicas, los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* y estudios *in vivo* se realizaron con los materiales hinchados luego de 2 días en PBS.

V.3.1.4 Medidas de ángulo de contacto

El ángulo de contacto puede ser definido como la facilidad con la que un fluido se propaga o adhiere sobre la superficie de un sólido y actúa como un indicador de la humectabilidad de la superficie de este, pudiendo relacionarlo directamente con la polaridad del material [Menzies & Jones, 2010]. Debido a que las primeras interacciones entre las células y la superficie del *scaffold* están dadas por interacciones débiles, el ángulo de contacto es un parámetro importante a estudiar. En la imagen V.8 se muestran fotografías de la gota de agua sobre los hidrogeles en distintos estados: *scaffolds* en estado seco y *scaffolds* luego de un hinchamiento de 2 días en PBS.

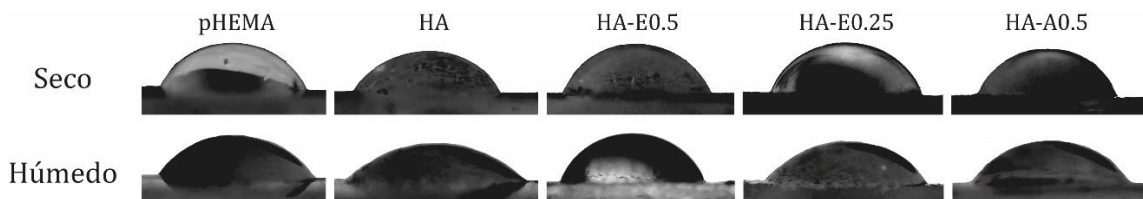


Imagen V.8. Imagen de gota de agua sobre los hidrogeles

La Tabla V.6 muestra el ángulo de contacto de los distintos hidrogeles, tanto en estado seco como luego de 2 días de incubación en PBS. Puede apreciarse que la incorporación de alginato a la mezcla de reacción produjo un cambio en la hidrofobicidad de los hidrogeles. Para los materiales secos, sólo cuando el polímero se incorporó sin cambiar las proporciones de EGDMA y AIBN (HA) se obtuvo un material más hidrofílico que pHEMA. En cambio, HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.5 resultaron menos hidrofílicos que pHEMA. Sin embargo, cuando se realizaron los estudios luego del hinchamiento a dos días en PBS, el único hidrogel menos hidrofílico que pHEMA fue HA-E0.5.

<i>Nombre</i>	Ángulo de contacto seco (°)	Ángulo de contacto húmedo (°)
<i>pHEMA</i>	52.1 ± 0.7	51.7 ± 0.7
<i>HA</i>	48.9 ± 0.4 a	49.1 ± 0.8 a
<i>HA-E0.5</i>	62.1 ± 1.1 a, b	52.3 ± 0.7 a, b
<i>HA-E0.25</i>	64.7 ± 0.3 a, b, c	41.7 ± 0.4 b, c
<i>HA-A0.5</i>	63.6 ± 0.2 a, b	45.5 ± 0.8 a, b, c, d

Tabla V.6. Ángulo de contacto de los hidrogeles. a: $p < 0.01$ vs. pHEMA; b: $p < 0.01$ vs. HA; c: $p < 0.01$ vs. HA-E0.5; d: $p < 0.01$ vs. HA-E0.25.

Estas variaciones en el ángulo de contacto pueden estar dadas por cambios en la composición química de los distintos hidrogeles, sin embargo, en nuestro grupo se ha demostrado previamente que cambios en la topografía de *scaffolds* químicamente iguales también pueden inducir modificaciones en estos valores [Lastra et al., 2018; Alfano & Fernández, 2015; Cortizo et al., 2012; Fernández et al., 2011]. Por otro lado, como se observa en la Tabla V.6, para el caso de los hidrogeles, la hidrofobicidad/hidrofilicidad de los mismos no solo depende de la topografía y composición química, sino también de su estado de hinchamiento y, probablemente, de la naturaleza del líquido retenido en sus cadenas.

V.3.1.5 Pruebas mecánicas

La Tabla V.7 muestra el Módulo de Young (E) determinado para los diferentes hidrogeles luego de dos días de incubación en PBS. Puede observarse que el parámetro calculado desde la curva de tensión vs. deformación, para el hidrogel pHEMA fue de 673 kPa. La incorporación de alginato en las diferentes mezclas produjo materiales con un Módulo de Young menor, resultando en membranas menos rígidas. Un efecto similar fue observado por La Gatta y colaboradores [La Gatta et al., 2009], que mostraron que el agregado de alginato a un hidrogel obtenido a partir de pHEMA-METAC (cloruro de [2-(metacriloxi)etil]trimetil-amonio), produce una disminución en el Módulo de Young de manera dependiente a la concentración del polisacárido. Por otro lado, al evaluar los resultados obtenidos dentro de la serie de hidrogeles con alginato, se observa una disminución abrupta en la rigidez de los materiales con menor contenido de EGDMA con

respecto a HA, aunque sin mostrar diferencias significativas entre las dos concentraciones utilizadas (0.25% y 0.5%). A su vez, una disminución en la concentración de iniciador produjo cadenas más largas que la red de HA, aportando a la elasticidad del material a través de una red más laxa con menor rigidez (Esquema V.2).

Nombre	E (kPa)
<i>p</i> HEMA	673 ± 44
HA	516 ± 30 a
HA-E0.5	204 ± 8 a, b
HA-E0.25	201 ± 5 a, b
HA-A0.5	374 ± 27 a, b, c, d

Tabla V.7. Módulo de Young (E) de los diferentes hidrogeles. a: $p < 0.01$ vs. *p*HEMA; b: $p < 0.01$ vs. HA; c: $p < 0.01$ vs. HA-E0.5; d: $p < 0.01$ vs. HA-E0.25.

El módulo elástico del cartílago está dado principalmente por la presencia de colágeno en la matriz extracelular del tejido, que depende fuertemente de la ubicación, la profundidad y la orientación de las fibras [Roth & Mow, 1980]. Lu [Lu et al., 2001] reportó que el cartílago posee valores que van desde los 320 y 1020 kPa; por lo que solo dos de nuestros hidrogeles (HA-E0.5 y HA-E0.25) presentan módulos por fuera de este rango. De este modo, y desde el punto de vista de las características mecánicas, HA y HA-A0.5 podrían ser aplicados en regeneración de cartílago. Por otro lado, la alta resistencia a la tracción en el hueso se encuentra atribuida a las fibras de colágeno reforzadas con cristales de hidroxapatita, que a su vez varía en gran medida entre el hueso trabecular y cortical. En el primero, los valores del Módulo de Young encontrados van desde 100 a 500 MPa, y entre 12000 y 18000 MPa para el segundo [Rezwan et al., 2006]. Puede observarse que ninguno de los hidrogeles sintetizados presentó un módulo comparable con estos datos. Sin embargo, el estudio de este parámetro no deja de ser importante ya que las propiedades del material de partida pueden ser modificadas con el agregado de cerámicas que aporten mayor resistencia y se ajusten a las necesidades de su aplicación.

V.3.2 Estudios de biocompatibilidad

V.3.2.1 Viabilidad celular

Las células condrocíticas, RAW 264.7 y CPMO se cultivaron sobre platos de cultivo estándar (control) o sobre los diferentes hidrogeles para evaluar la adhesión y proliferación luego de 2 y 48 h, respectivamente. La Figura V.4 muestra que las células condrocíticas se adhirieron a todos los materiales de manera comparable con el control (C). Por otro lado, luego de 48 h se observó un efecto similar para todos los *scaffolds* estudiados excepto en pHEMA, en el que se encontró una disminución estadísticamente significativa con respecto al resto de las condiciones experimentales.

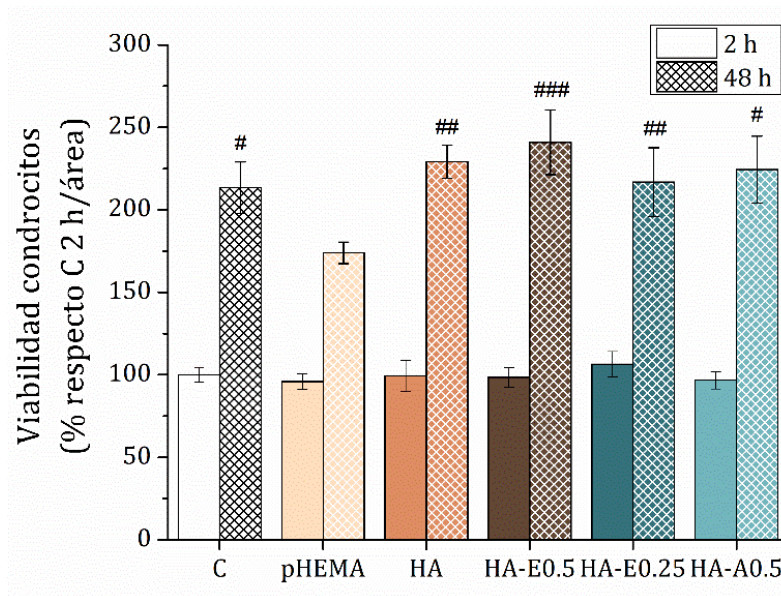


Figura V.4. Adhesión y proliferación celular de condrocitos luego de 2 y 48 h, respectivamente sobre los hidrogeles. Diferencias vs pHEMA a 48 h: #: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$.

Una tendencia similar pudo observarse al evaluar la viabilidad celular de los macrófagos RAW 264.7 (Figura V.5), en donde los *scaffolds* con alginato favorecieron el crecimiento celular con respecto a pHEMA ($p < 0.001$), sin mostrar diferencias significativas entre los mismos o con el control. Por su parte, tampoco se encontraron diferencias significativas en la adhesión (2 h) de los macrófagos al plato de cultivo estándar o a las diferentes matrices estudiadas.

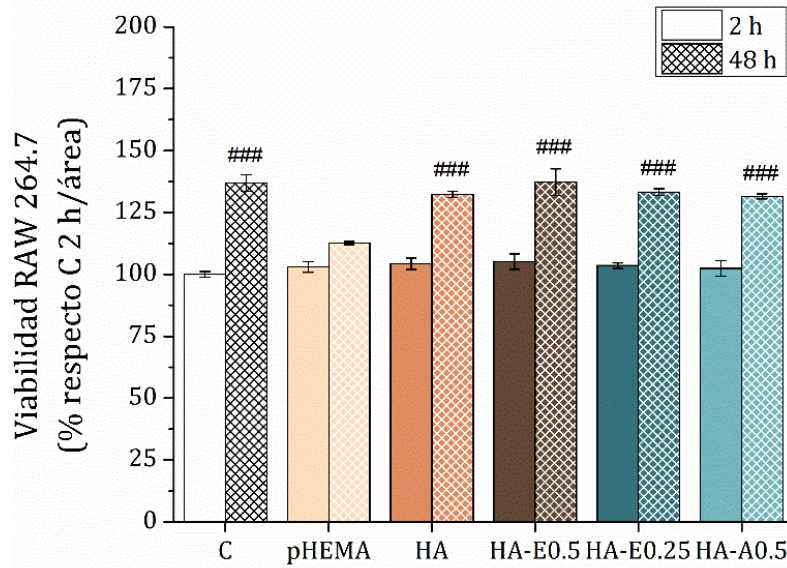


Figura V.5. Adhesión y proliferación celular de macrófagos RAW 264.7 luego de 2 y 48 h, respectivamente sobre los hidrogeles. ###: $p < 0.001$ vs. pHEMA a 48 h.

La Figura V.6 muestra que la adhesión de las CPMO luego de 2 h de incubación fue un 40% mayor en cualquiera de los hidrogeles estudiados con respecto a la condición control ($p < 0.001$). Se ha demostrado previamente que la adhesión celular depende tanto del tiempo de secreción de la MEC como de la interacción las proteínas de adhesión con el material [Kawano et al., 2001]. Es posible que el aumento de la adhesión obtenido en los hidrogeles se deba a una mayor secreción de MEC por parte de este tipo celular o por la formación de complejos de adhesión más estables. Por otro lado, cuando se evaluó la proliferación luego de 48 h de cultivo, se observó que las CPMO crecían mejor sobre todos los *scaffolds* desarrollados, en comparación con el plástico control. Además, se encontró que el agregado de alginato a los hidrogeles indujo un incremento estadísticamente significativo en la proliferación celular tanto con respecto a la condición control ($p < 0.001$) como a las células crecidas sobre una matriz de pHEMA ($p < 0.001$).

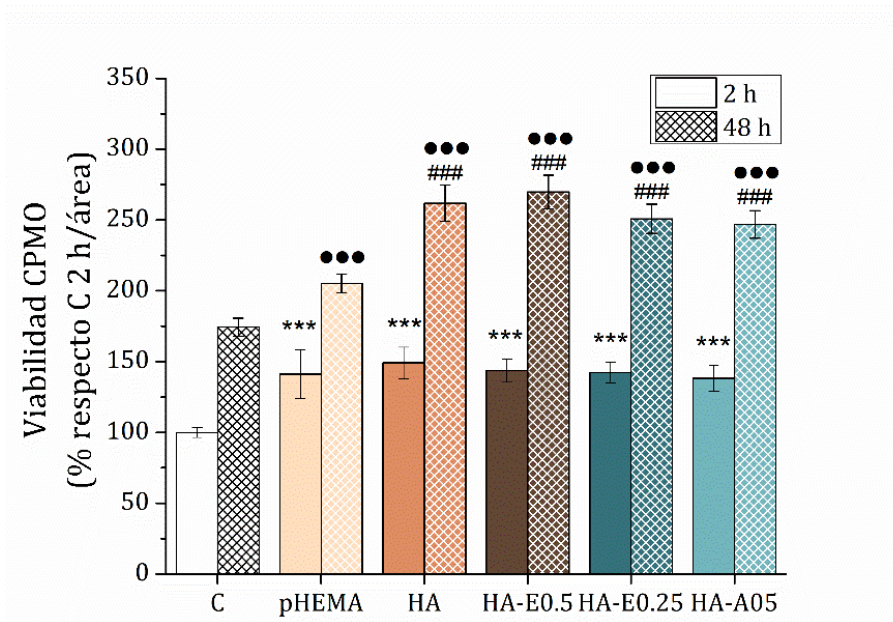


Figura V.6. Adhesión y proliferación celular de CPMO luego de 2 y 48 h, respectivamente, sobre los hidrogeles. ***: $p < 0.001$ vs. Control (C) a 2 h; ●●●: $p < 0.001$ vs. C a 48 h y ###: $p < 0.001$ vs. pHEMA a 48 h.

V.3.2.2 Evaluación de la capacidad osteogénica

Se evaluó la capacidad de las células CPMO crecidas sobre los hidrogeles para diferenciarse hacia el fenotipo osteoblástico. Para este estudio se midió la actividad de la fosfatasa alcalina (FAL) luego de cultivar las células CPMO durante 15 días en medio osteogénico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V.7. Puede observarse que las células expresaron FAL bajo todas las condiciones experimentales sin diferencias significativas entre el plato de cultivo estándar o los diferentes *scaffolds* desarrollados.

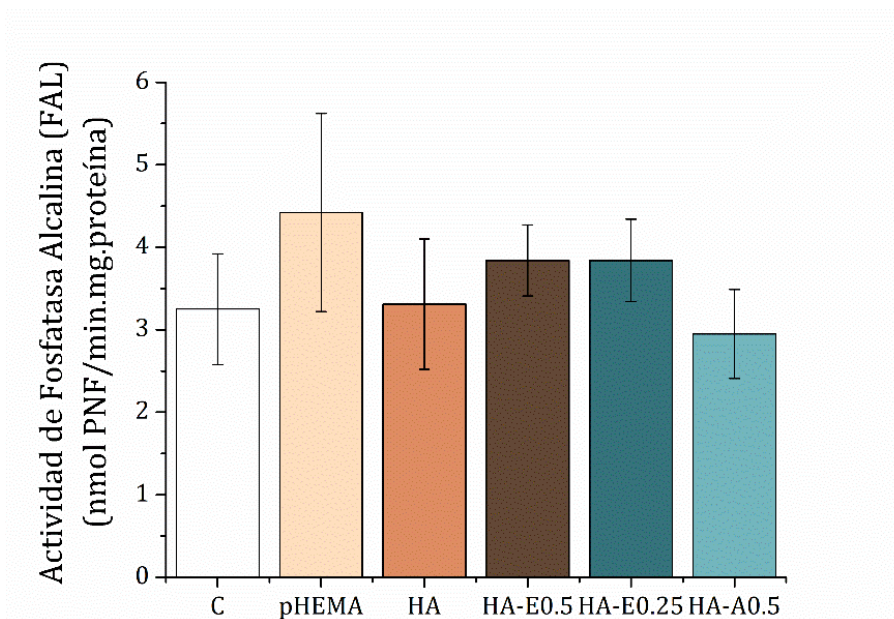
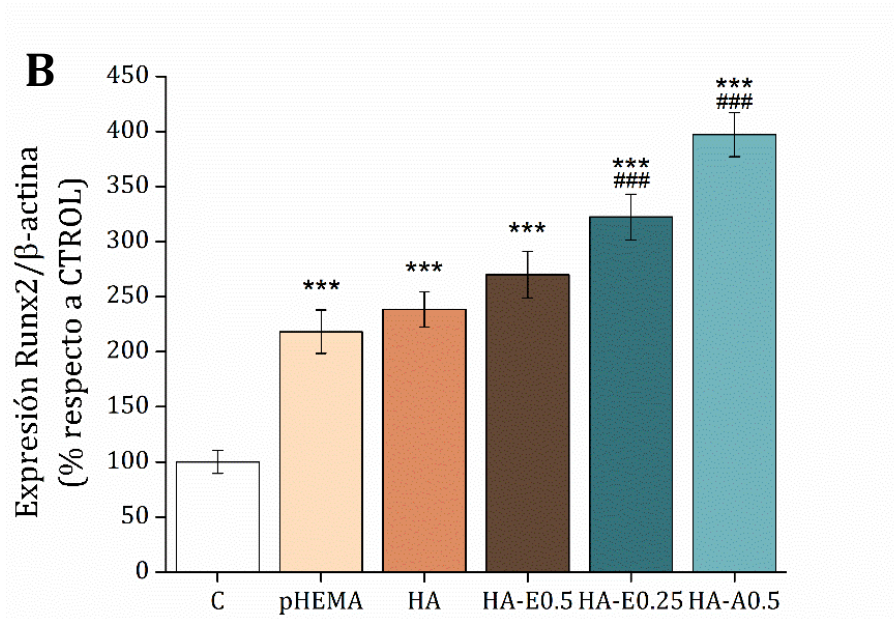
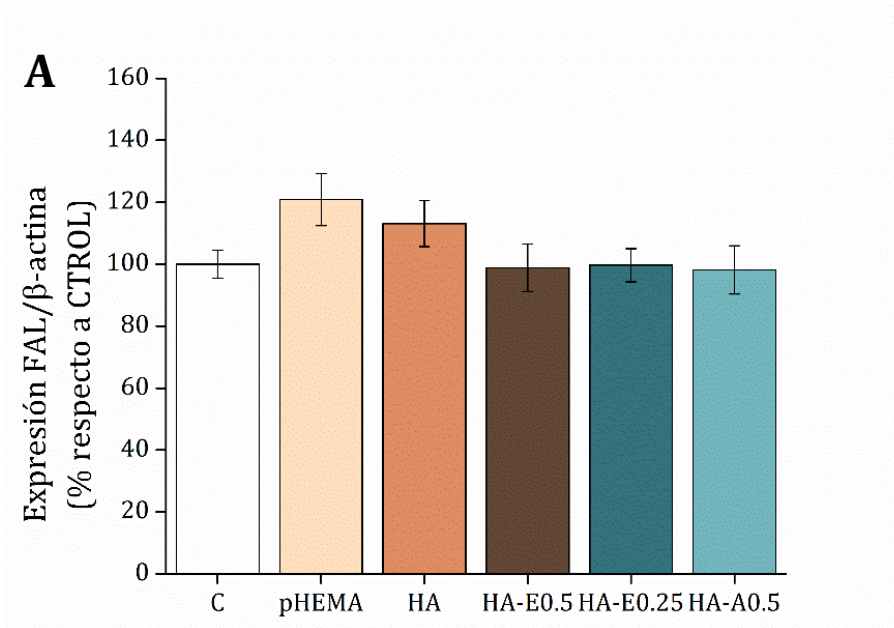


Figura V.7. Actividad de fosfatasa alcalina luego de 15 días de cultivo.

También se evaluó la expresión de ARNm para los marcadores moleculares osteogénicos fosfatasa alcalina (FAL), Runx2 y Colt1 por RT-PCR (Figura V.8). El análisis de las bandas mostró que las células CPMO crecidas y diferenciadas durante 15 días sobre los hidrogeles expresaron niveles similares de mensajero para FAL (Figura V.8 A), efecto que correlaciona con la actividad enzimática presentada en la Figura V.6. Por otro lado, al estudiar la expresión de Runx-2 puede verse que todos los hidrogeles, con y sin alginato, presentaron valores significativamente entre dos y cuatro veces mayores con respecto al control ($p < 0.001$, Figura V.8 B). No se hallaron diferencias significativas en la expresión de pHEMA con respecto a HA. A su vez, de las matrices con variaciones en la concentración de entrecruzante e iniciador, solo HA-E0.5 no mostró un aumento en la expresión del marcador con respecto a HA. Una tendencia similar se observó en el caso del marcador Colt1 (Figura V.8 C), con la única diferencia de que la expresión fue significativamente mayor a HA cuando las células se diferenciaron sobre las membranas HA-E0.5 ($p < 0.5$), HA-E0.25 y HA-A0.5 ($p < 0.001$).



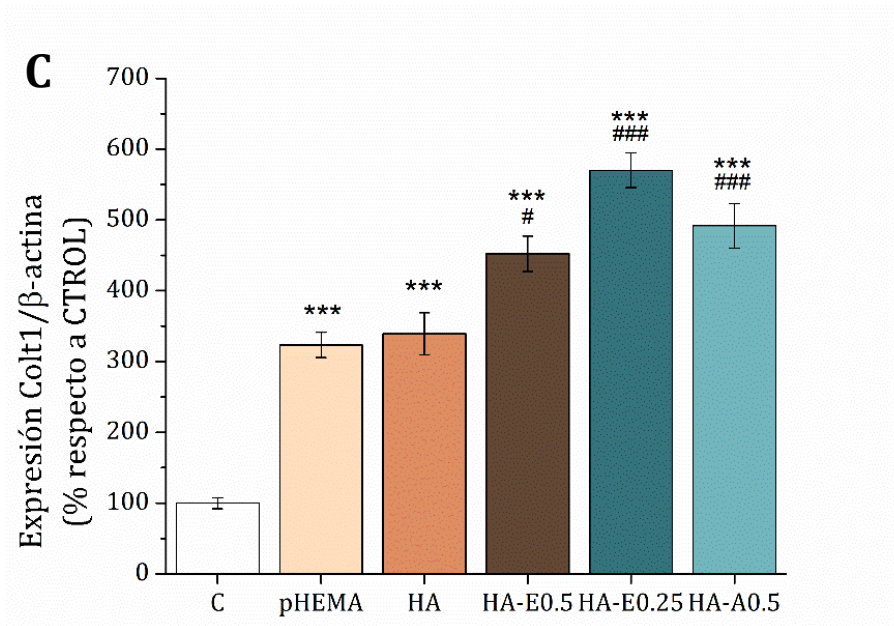


Figura V.8. Expresión de marcadores osteogénicos en CPMO luego de 15 días de cultivo: A) Fosfatasa alcalina (FAL) B) Runx-2 C) Colágeno tipo 1 (Colt1). Diferencias vs Control (C): ***, $p < 0.001$; Diferencias vs pHEMA: #, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$.

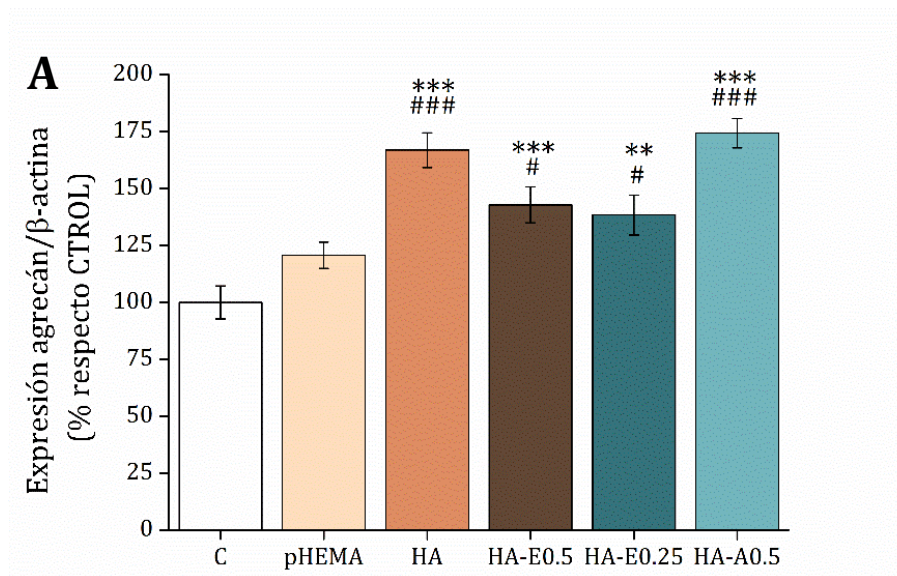
Resultados similares fueron descriptos por Westhrin y colaboradores [Westhrin et al., 2015], quienes encapsularon células madre mesenquimales humanas en perlas de alginato entrecruzadas con CaCl_2 , que luego fueron cultivadas en medio osteogénico suplementado con la sal de calcio para evitar la disolución del material. En estos ensayos, los autores observaron un aumento significativo en la expresión de Runx2 y Colt1 al compararlo con las células creciendo en monocapa, también en medio osteogénico.

Los resultados obtenidos en los ensayos de diferenciación en el presente trabajo de tesis permitieron evaluar la funcionalidad y progresión hacia el fenotipo osteoblástico, demostrando que tanto la incorporación del alginato como la composición del material tienen un efecto que favorece la capacidad osteogénica del material. En conjunto, estos estudios nos permitieron aumentar la información sobre la biocompatibilidad del material, obteniendo así un panorama general acerca de su potencial aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo.

V.3.2.3 Evaluación de la capacidad condrogénica

Para poder evaluar la estabilidad del fenotipo condrogénico, las células condrocíticas se cultivaron durante diez días sobre los diferentes *scaffolds*. Se evaluó el efecto de la incorporación de alginato en los hidrogeles sobre la capacidad de estas células de expresar los marcadores agregacán, SOX9, Colt2 y un marcador no condrogénico (Colt1).

La Figura V.9 muestra la expresión de distintos marcadores en los condrocitos crecidos por diez días en platos de cultivo estándar (como control) y en los diferentes hidrogeles. Luego de 10 días, los niveles del marcador agregacán, SOX9 y Colt2 de las células condrocíticas fueron significativamente mayores cuando las mismas crecieron sobre HA, HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.5 *scaffolds*, en lugar de pHEMA o el control. Por lo tanto, la incorporación de alginato a la mezcla de reacción produce hidrogeles que favorecen la expresión de los marcadores condrogénicos.



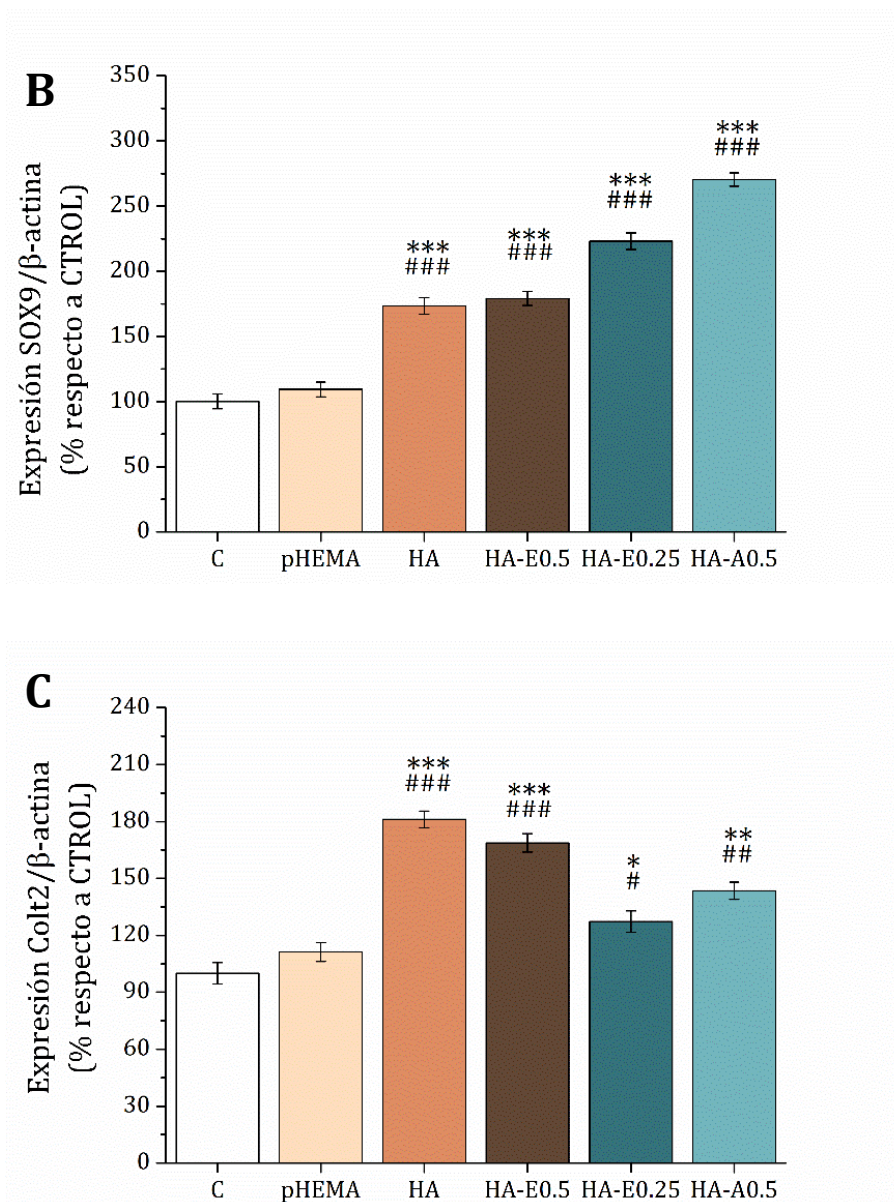


Figura V.9. Expresión de marcadores condrogénicos en condrocitos cultivados sobre los hidrogeles luego de 10 días: A) agregán B) SOX9 C) Colágeno tipo 2 (Colt2). Diferencias vs Control (C): *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Diferencias vs pHEMA: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$.

Una de las principales desventajas de usar condrocitos de fuentes autólogas es que, durante la expansión del cultivo en monocapa, estas células se dediferencian, perdiendo la habilidad de expresar sus marcadores fenotípicos [Dubey & Deng, 2018; Vinatier & Guicheux, 2016] y su morfología cambia hacia el fenotipo fibroblástico [Armiento et al., 2018; Krajewska-Włodarczyk et al., 2018]. A medida que el tiempo de cultivo de las células aumenta, no solo disminuye la expresión de los genes como colágeno tipo 2 (Colt2), GAGs, agregán y SOX9, sino que también aumentan los niveles

de expresión de marcadores no condrogénicos como colágeno tipo 1 (Colt1). Algunos autores han demostrado que una organización espacial tridimensional en un cultivo es esencial para la correcta producción de matriz extracelular por los condrocitos [Lu et al., 2001].

Además, la estabilización de los fenotipos condrogénicos debe ser evaluada y, por lo tanto, se debe determinar la expresión de Colt1. La Figura V.10 muestra niveles similares de expresión de este marcador cuando los condrocitos fueron sembrados sobre el plato de cultivo control o sobre *scaffolds* de pHEMA, HA y HA-E0.5 durante 10 días de cultivo. Por otro lado, se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de Colt1 cuando estas células crecieron sobre *scaffolds* de HA-E0.25 y HA-A0.5. En conjunto, nuestros resultados podrían sugerir que, bajo estas dos últimas condiciones, se produciría una estimulación más adecuada del desarrollo condrogénico.

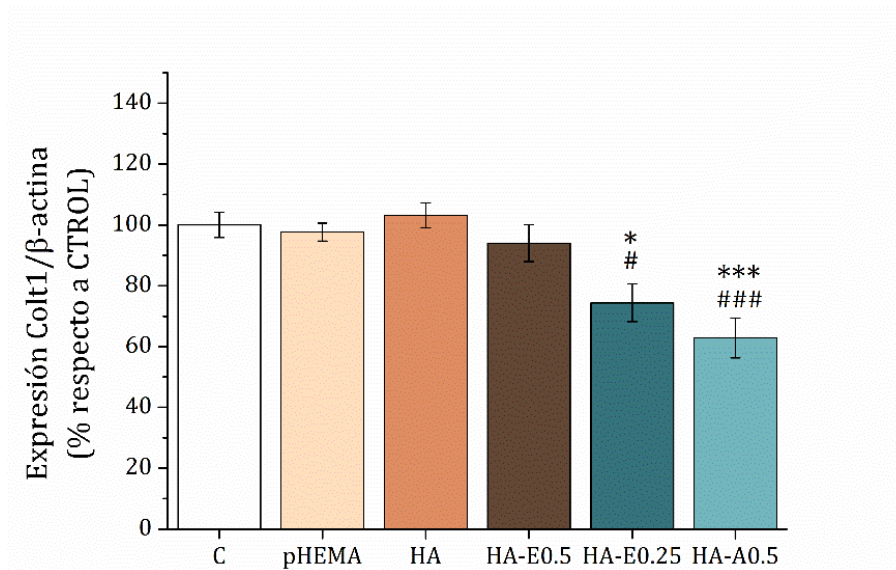


Figura V.10. Expresión del marcador no condrogénico, Colt1, en condrocitos cultivados sobre los hidrogeles luego de 10 días. *: $p < 0.05$ vs. Control; ***: $p < 0.001$ vs. Control; #: $p < 0.05$ vs. HEMA; ###: $p < 0.001$ vs. HEMA.

Estos resultados concuerdan con los publicados por Lee y colaboradores [Lee et al., 2003], quienes cultivaron condrocitos en perlas de alginato entrecruzadas con calcio en DMEM suplementado con CaCl_2 y compararon la síntesis Colt1 y Colt2 con respecto a las células sembradas sobre platos de cultivo estándar mediante técnicas de inmunolocalización. Ellos observaron que los pasajes de células en monocapa

expresaron muy bajas cantidades del marcador específico de cartílago hialino, Colt2, en comparación con las células encapsuladas en alginato. Además, detectaron un aumento en la expresión de Colt1, indicativo de la formación de cartílago fibroso, mientras que en los condrocitos cultivados con alginato mostraron valores mínimos de este marcador. Por otro lado, Murphy y Sambanis [Murphy & Sambanis, 2001] también evaluaron el efecto del encapsulamiento de condrocitos en perlas de alginato durante cuatro semanas, analizando la expresión de los niveles de ARN de Colt1, Colt2 y agregán para compararlos con las células cultivadas en monocapa. Al igual que en este trabajo de tesis, dichos autores observaron un gran aumento en la expresión de los marcadores condrogénicos en presencia de alginato, acompañado de una disminución de Colt1; mientras que las células crecidas en el plato de cultivo estándar mostraron resultados opuestos.

De esta manera, la incorporación de alginato a la mezcla de reacción produce hidrogeles que aumentan la expresión de marcadores condrogénicos (HA, HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.5). Además, tanto HA E0.25 como HA A0.5, lograron una estabilidad del fenotipo de las células (observado por una disminución de Colt1) al menos durante el periodo de tiempo estudiado. Como se ha mencionado anteriormente, la expresión de Colt2 y agregán se encuentra relacionada a la síntesis de moléculas fundamentales para el correcto desarrollo de la MEC cartilaginosa; mientras que se demostró que SOX9 es necesario para la diferenciación condrogénica y la expresión de estos dos genes [De Crombrughe et al., 2000]. Particularmente, se sabe que SOX9 se une y activa elementos específicos que favorecen la expresión de los genes que codifican para Colt2 y agregán, y sus perfiles de expresión son similares a aquellos de Colt2 en la condrogénesis [Zhou et al., 1995; Sekiya et al., 2000]. Los efectos mencionados, además, podrían deberse a la similitud que existe entre el alginato y el ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular del cartílago, que es conocido por su rol fundamental en la proliferación y diferenciación de los condrocitos [Li et al., 2019].

V.3.2.3 Evaluación de citotoxicidad

Para evaluar la potencial respuesta inmunogénica de los diferentes hidrogeles, se cultivaron células RAW 264.7 derivadas de macrófagos sobre los hidrogeles por 48 h

y se determinó la liberación de NO. La Figura V.11 muestra que los macrófagos responden al efecto tóxico del LPS (control positivo) induciendo un incremento estadísticamente significativo en la liberación de NO al medio de cultivo. Por otro lado, cuando las células crecen sobre el *scaffold* de pHEMA se observó un leve, pero estadísticamente significativo, aumento en los niveles de producción de NO respecto al plato de cultivo control. Finalmente, cuando los macrófagos crecieron sobre los hidrogeles que contenían alginato, no se observó una respuesta citotóxica, siendo los niveles de producción de NO comparables a las células crecidas sobre el plato de cultivo estándar. Por lo tanto, la incorporación de alginato en las mezclas de reacción parece prevenir la citotoxicidad inducida por pHEMA, independientemente de las variaciones en la composición de la mezcla de síntesis de sIPN estudiadas.

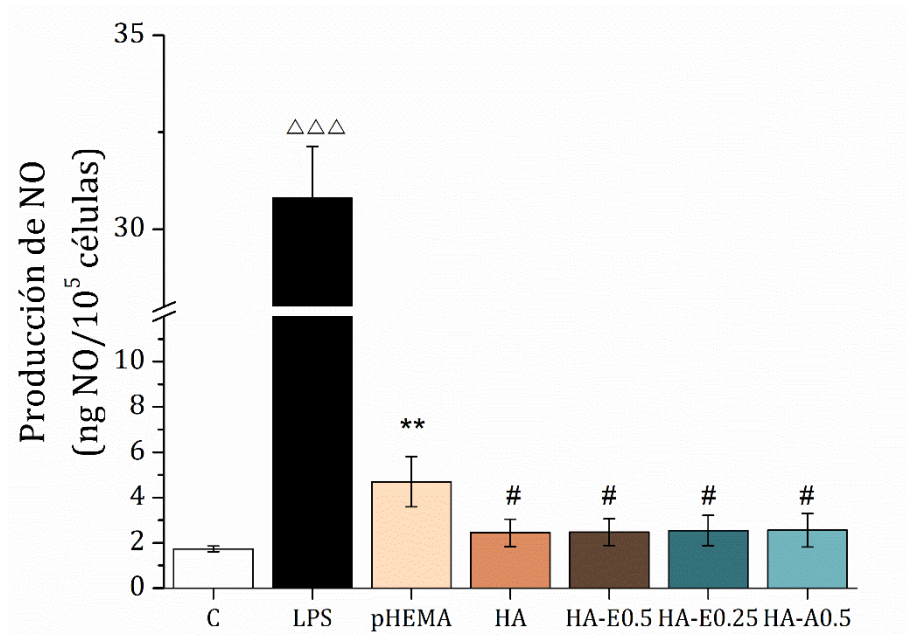


Figura V.11. Producción de NO de células RAW 264.7 cultivadas sobre los hidrogeles y el control positivo de citotoxicidad (LPS). #: $p < 0.05$ vs. pHEMA; **: $p < 0.001$ vs. control (C), △△△: $p < 0.001$ vs. control y todos los hidrogeles.

Algunos autores han sintetizado hidrogeles con HEMA-co-METAC conteniendo alginato [La Gatta et al., 2009]. A pesar de haber utilizado otro tipo celular para su evaluación, también demostraron que una red de HEMA semi-interpenetrada con alginato no posee efectos tóxicos. Recientemente, Kim y colaboradores desarrollaron un hidrogel usando HEMA y alginato [Kim et al., 2019]. Ellos cultivaron células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana sobre el material, probando que

había una buena biocompatibilidad. Sin embargo, también observaron que el hidrogel no se hinchaba y, por lo tanto, no podía ser recomendado para regeneración de tejidos del tipo cartilaginoso.

V.3.3 Estudios de caracterización *in vivo*: modelo de lesión ósea

Tal y como se detalló en el apartado V.2.5 sobre las responsabilidades del uso y manejo de animales de laboratorio, es necesario agotar los experimentos *in vitro* para justificar la elección de los materiales a utilizar *in vivo* a fin de reducir el número de sujetos de experimentación. Es por ello que se han seleccionado pHEMA y HA con el fin de estudiar el efecto del agregado de alginato en la reparación ósea. Además, tanto HA-E0.5 como HA-E0.25 y HA-A0.5 han demostrado tener una excelente capacidad osteogénica *in vitro*, motivo por el cual se ha elegido HA-E0.25 como material representativo para su evaluación *in vivo*.

Las membranas fueron cortadas con un sacabocados en círculos de 2 mm de diámetro (Imagen V.9). Tal como se mencionó anteriormente, previamente a su implantación, las mismas fueron esterilizadas e hidratadas durante 48 h en PBS.

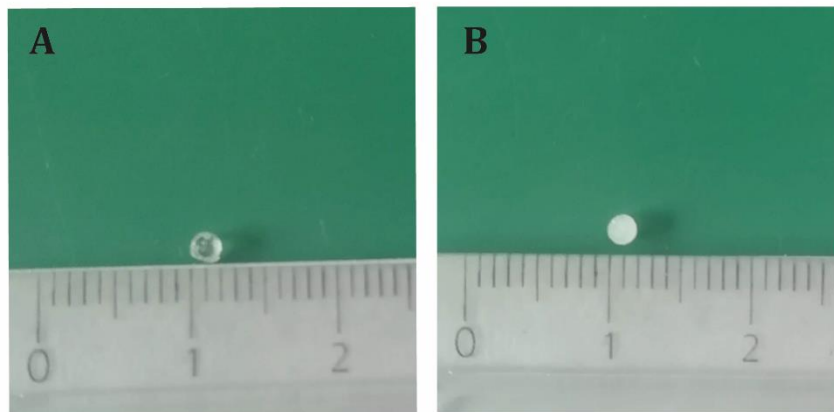


Imagen V.9. Membranas hidratadas en PBS. A) pHEMA y B) HA, representativa también de HA-E0.25.

Luego de los 30 días post cirugía, se sacrificó a los animales en ayunas y se recolectaron las calotas para realizar la evaluación histológica e histomorfométrica, tal como fue indicado en la sección de materiales y métodos.

En la Figura V.11, pueden observarse los resultados de la reosificación del hueso y el porcentaje de relleno de tejido conjuntivo en presencia y ausencia de los *scaffolds*, que se obtuvieron tal como se indicó en la sección V.2.5.3.3.

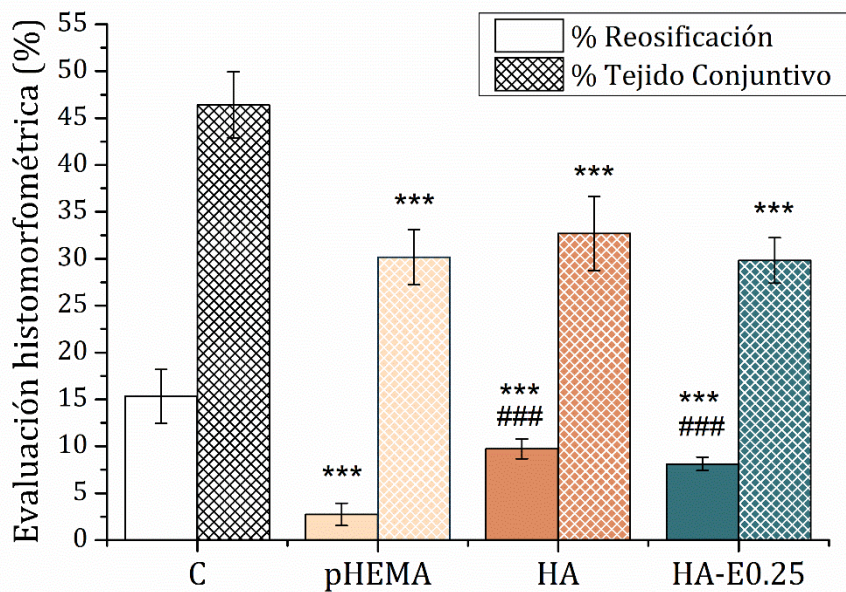


Figura V.12. Reosificación (liso) y relleno de tejido conjuntivo (entramado) del defecto óseo. ***: $p < 0.001$ vs Control (C); ###: $p < 0.001$ vs pHEMA.

La reosificación en el defecto sin material (condición control) fue del $15.3\% \pm 2.9\%$, dato que resultó ser significativamente mayor con respecto a todos los hidrogeles ($p < 0.001$). A su vez, HA y HA-E0.25 no mostraron diferencias entre sí, pero sí con respecto a pHEMA, que alcanzó un valor de reosificación sólo del $2.74\% \pm 1.2\%$. Por otra parte, al evaluar la cantidad de relleno obtenido por la formación de tejido conjuntivo en la herida, se obtuvo una mayor producción por parte del control ($46.4\% \pm 3.5\%$), mientras que pHEMA ($30.2\% \pm 3.0\%$), HA ($32.7\% \pm 3.9\%$) y HA-E0.25 ($29.8\% \pm 2.4\%$) no presentaron diferencias significativas entre sí. En primera instancia, estos resultados podrían ser desalentadores, sin embargo, no pueden utilizarse de manera aislada. En la Imagen V.10 se muestra un corte representativo del defecto óseo en la condición control y en presencia de los *scaffolds*.

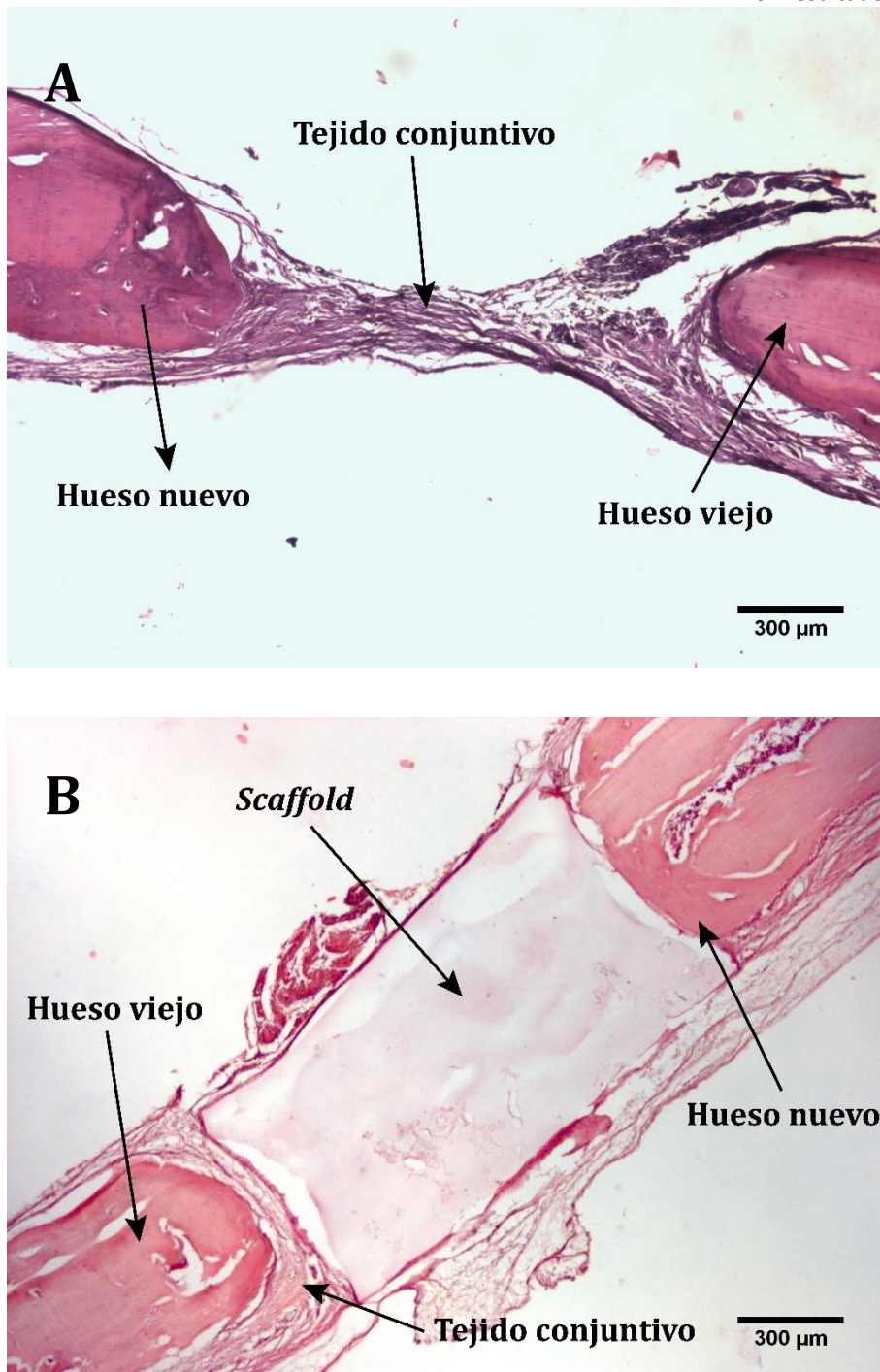


Imagen V.10. Micrografías 4X del corte del defecto A) control; B) HA-E0.25 a modo representativo de los cortes realizados en pHEMA y HA.

Las imágenes V.10 B muestra que el *scaffold* ocupa una gran proporción del defecto óseo, incluso luego de 30 días, hecho que se observó también para pHEMA y HA. Se puede observar que no hubo penetración de las células hacia el interior de los materiales, fundamentalmente debido a la falta de estructuras porosas con tamaño adecuado (Tabla V.4). Se ha demostrado que un gran volumen de poros interconectados

en un *scaffold* permite una correcta vascularización y colonización celular, así como el flujo de nutrientes y la apropiada eliminación de desechos a través del mismo [Sanzana et al., 2014]. La carencia de este tipo de arquitectura podría ser uno de los motivos por los cuales las matrices no han logrado degradarse lo suficiente (a lo sumo alrededor de un 10% en un sistema celular, observado *in vitro*) para dar lugar a la regeneración del tejido. Por lo tanto, es posible que los valores obtenidos para la reosificación y el relleno de tejido conjuntivo hayan sido menores en comparación con el control, en parte, debido a la falta de espacio físico provocada por el material.

En la condición control (Imagen V.10 A) se puede apreciar que la herida no está totalmente consolidada, es decir, que el período de estudio resultó insuficiente para cerrarla con tejido óseo nuevo. El tejido conjuntivo observado después de 30 días es escaso en comparación con el tamaño total del defecto y presenta fibras que se concentran en el centro de la lesión. El hueso nuevo regenerado puede identificarse en los márgenes de la herida, mostrando una menor organización con respecto al tejido óseo nativo (hueso viejo). Por otro lado, a pesar de la falta de porosidad, en pHEMA, HA y HA-E0.25 se puede observar que los mismos se encuentran rodeados de tejido conectivo que estabiliza la herida.

Como se ha mencionado anteriormente, la matriz extracelular (MEC) de los tejidos es una red compleja asociada a familias de proteínas (colágenos, proteoglicanos, elastina, etcétera) que se encuentran presentes en todos los tejidos conectivos. Esto hace que, ante la presencia de alguna patología o efecto tóxico sobre el organismo, la orientación de las fibras de colágeno se vea modificada, afectando así a la organización y/o heterogeneidad de la MEC [Lattouf et al., 2014]. Una técnica sencilla y simple para detectar cambios en la morfología del tejido conjuntivo es la tinción por Picrosirius red. Hasta hace poco, esta técnica era utilizada para identificar distintos tipos de colágeno de acuerdo con su coloración bajo luz polarizada. Por ejemplo, una birrefringencia de color amarillo-rojo era asignada al colágeno tipo I, mientras que al colágeno tipo III era asociado con una birrefringencia débil de fibras verdosas [Junqueira et al., 1979]. Actualmente, varios autores han reportado que los colores polarizados en la tinción de Picrosirius red dependen solo del grosor de las fibras y su empaquetamiento, más no de la composición de los tipos de colágeno específicos en la matriz. Esto se debe a que el

color de las fibras de colágeno varía según la rotación del polarizador, pasando de amarillo o naranja a verde de un instante al siguiente [Lattouf et al., 2014]. Sin embargo, esta coloración aún sigue entre los métodos más poderosos asociados al análisis morfológico de imágenes para estudiar las redes de colágeno en los tejidos en remodelación y/o reparación. Por este motivo, en este trabajo de tesis, utilizamos esta tinción para analizar la organización del tejido conjuntivo formado en el defecto óseo de calotas de rata.

En la Imagen V.11 se pueden observar cortes representativos de la herida en la condición control y de la herida con cada uno de los *scaffolds*, utilizando la coloración por Picrosirius red. En las imágenes se aprecia que lo que rodea a los materiales es, efectivamente, tejido conjuntivo sano que se organiza de manera similar al control, rodeando las matrices y utilizándolas para estabilizar la herida.

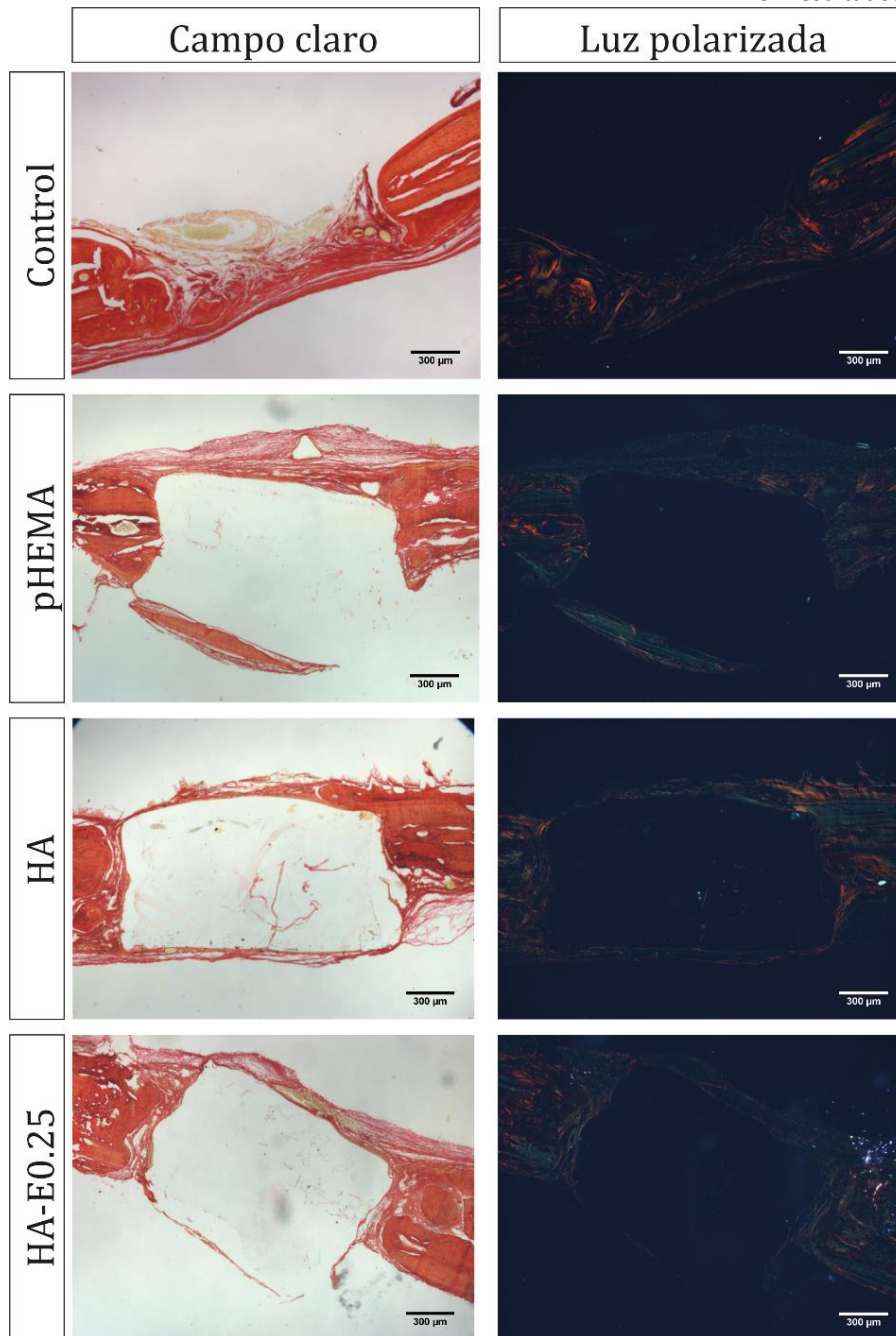


Imagen V.11. Micrografías 4X del corte del defecto teñido con Picrosirius red, con y sin luz polarizada.

Por otra parte, al observar la zona de hueso nuevo a mayor aumento, tanto en HA (Imagen V.12 A) como en HA-E0.25 (Imagen V.12 B), se pueden visualizar osteocitos rodeados por osteoide (flechas verdes) y osteoblastos en la superficie en regeneración, que se reconocen por su morfología cuboidal (flechas azules). Más aún, en ambos hidrogeles se visualizaron frentes de reosificación en el margen adyacente al *scaffold* (Imagen V.12 A y B, flecha amarilla) que indicaría la inducción de la regeneración ósea

dada principalmente por la presencia del material. Para estas condiciones también se puede apreciar la formación de tejido conjuntivo denso y robusto bordeando los materiales.

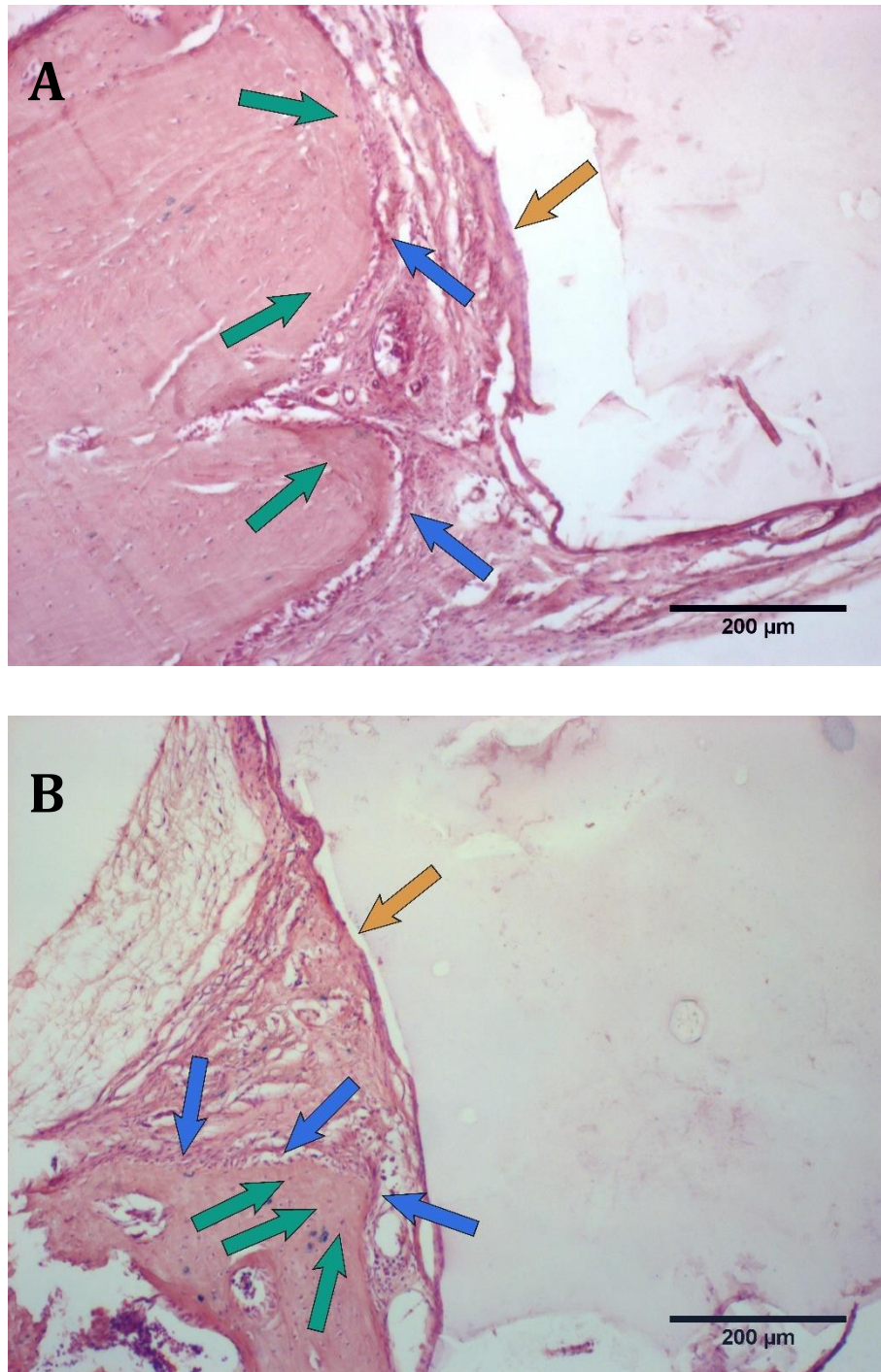


Imagen V.12. Micrografías 10X del corte del defecto A) HA y B) HA-E0.25.

Además, en HA (Imagen V.13 A) y HA-E0.25 (Imagen V.13 B) también se puede visualizar la presencia de vénulas (flechas blancas) y arteriolas (flechas naranjas), con

glóbulos rojos en su interior, que vascularizan el tejido conjuntivo que rodea a los *scaffolds*. La angiogénesis, o la formación de vasos sanguíneos, resulta fundamental para la reparación de hueso. Los nuevos vasos llevan oxígeno y nutrientes al sitio de regeneración y sirven de ruta para que, tanto células inflamatorias como células precursoras de hueso logren alcanzar el sitio de lesión [Hankenson et al., 2011].

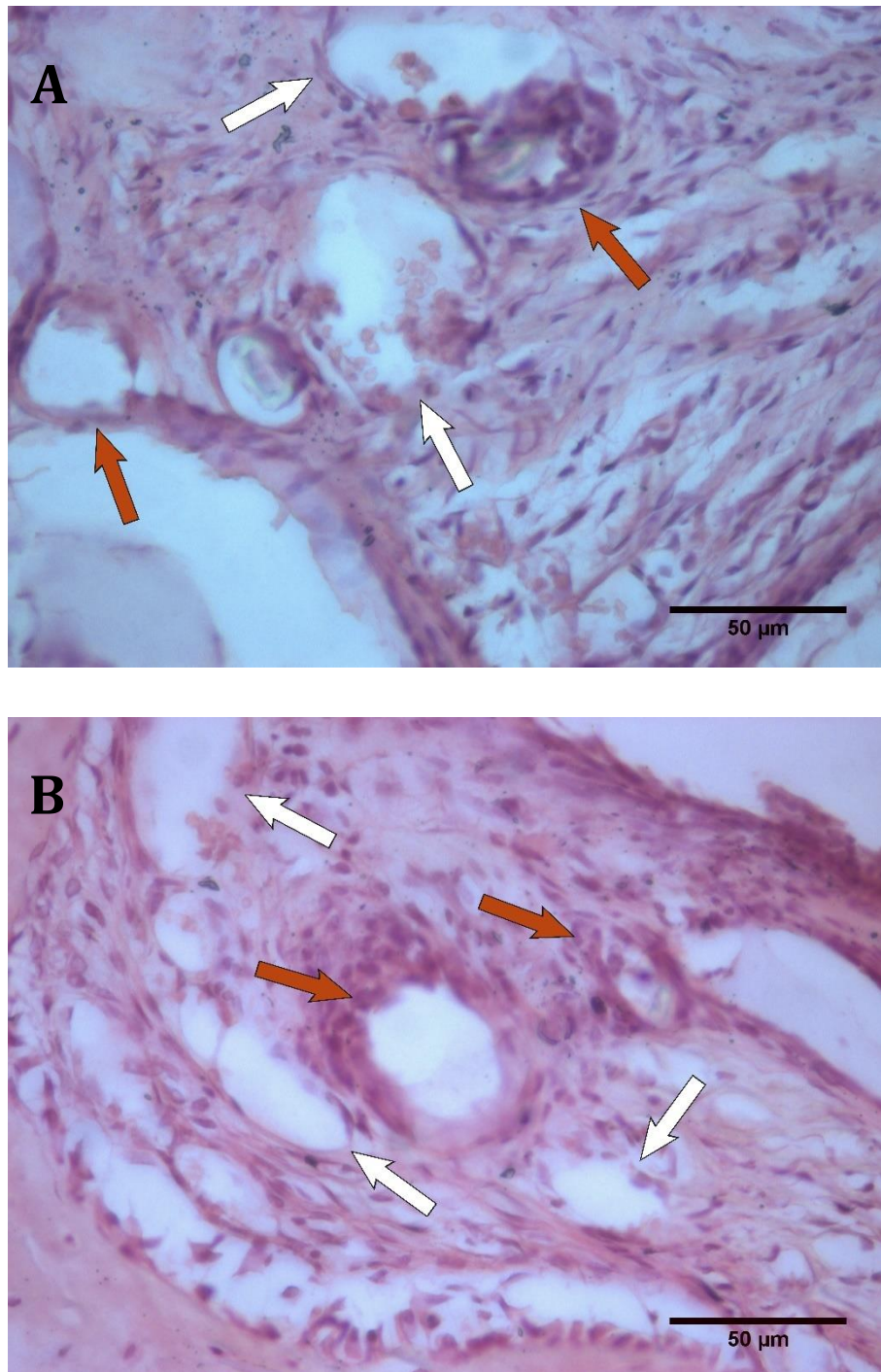


Imagen V.13. Micrografías 40X del corte del defecto A) HA y B) HA-E0.5.

Por otro lado, en HA se observó un hecho sumamente interesante, que se observa también en la Imagen V.11. Aparentemente, durante el desarrollo de este ensayo, el material parece haberse quebrado. Eso derivó en la formación de grietas en varios sitios que permitió la colonización por parte de células del tejido conectivo y la posterior secreción de MEC (Imagen V.14 A, flechas celestes). Además, en la Imagen V.14 B se puede apreciar con mayor aumento la presencia de células y de tejido conjuntivo en estas grietas (flechas violetas).

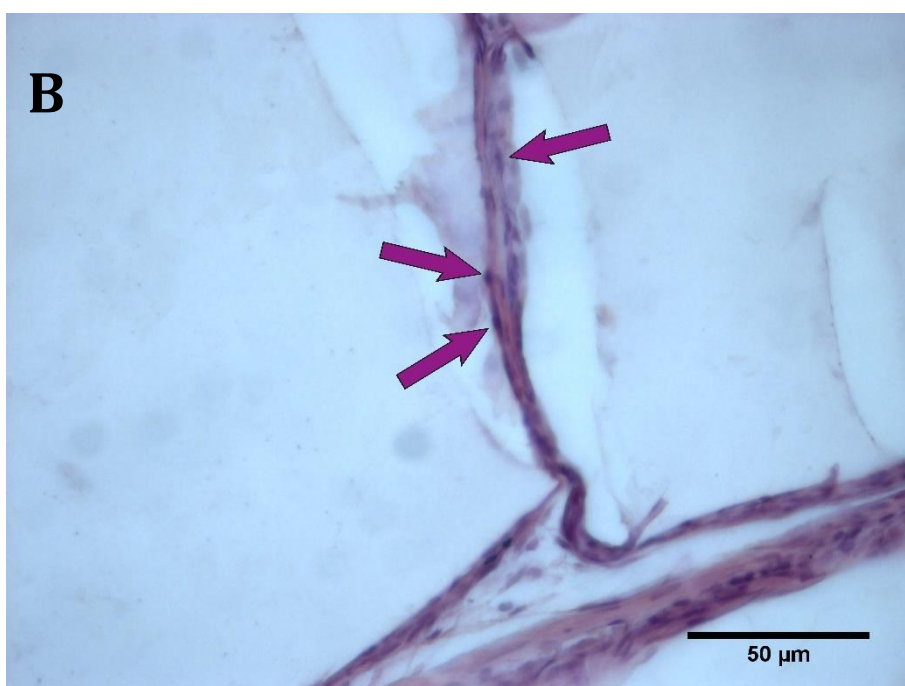
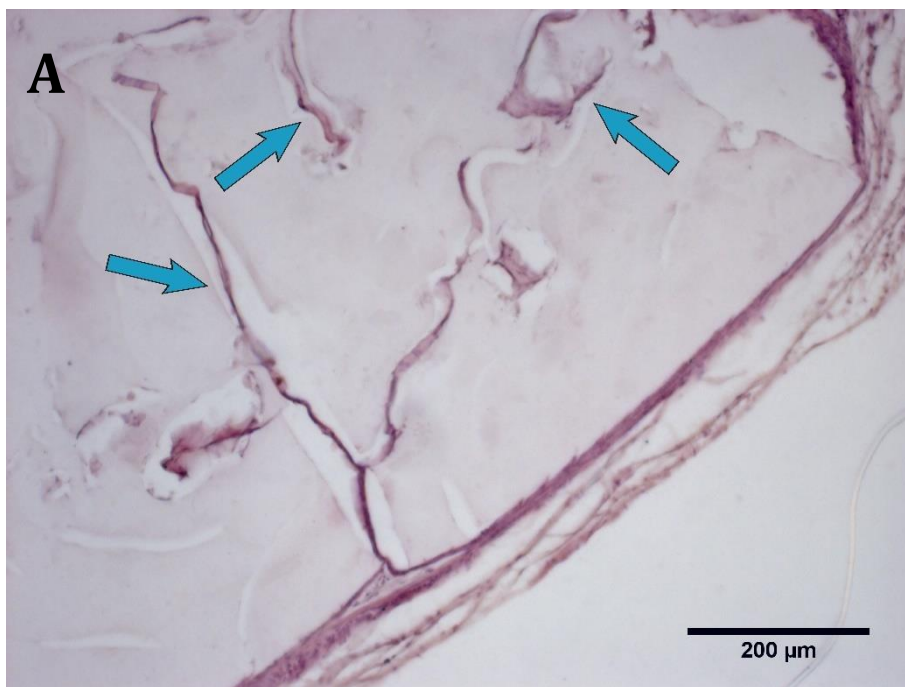


Imagen V.14. Micrografía del corte del defecto de HA a A) 10X y B) 40X.

Para corroborar estos resultados, se utilizó una tinción con Picrosirius red. Se analizaron los cortes histológicos de HA con y sin luz polarizada (Imagen V.15 A y B respectivamente) observando que, efectivamente, se produjo la formación de fibras de colágeno en el interior del material. Por lo tanto, esto demostraría que la composición del *scaffold* resulta adecuada para favorecer la colonización celular, la secreción de MEC y la posterior regeneración ósea.

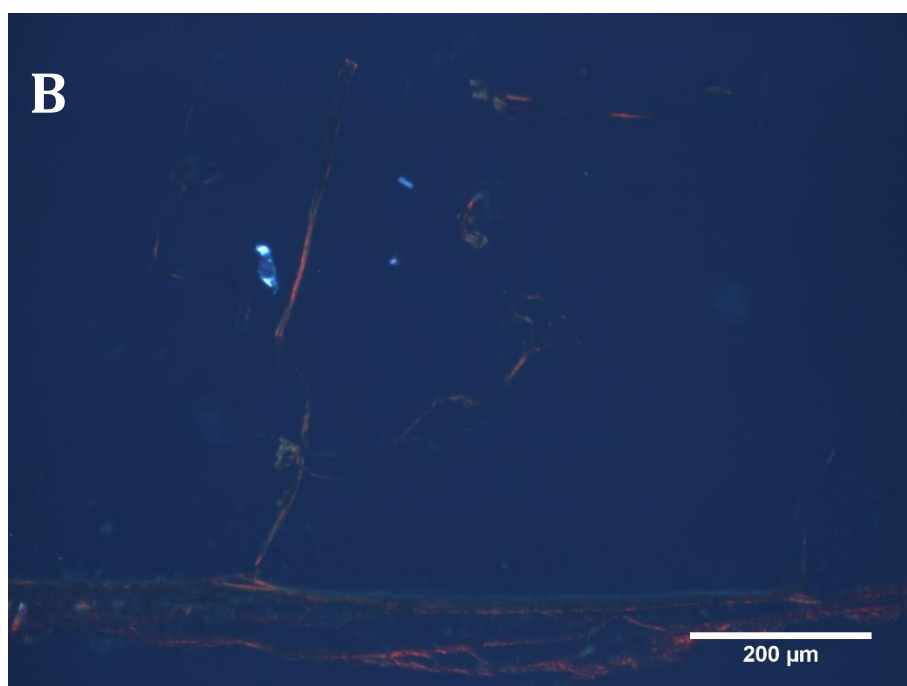


Imagen V.15. Micrografías del corte del defecto de HA teñidas con Picosirus red en A) campo claro y B) luz polarizada.

HA-E0.25 presentó imperfecciones en el material, pero en menor cantidad y sin población celular, lo que podría sugerir que las mismas se encontraban inaccesibles para las células o que fueron creadas durante el proceso de preparación de los cortes.

Finalmente, pHEMA mostró una menor reosificación y formación de tejido conjuntivo tanto en el análisis histomorfométrico como en el histológico. En la Imagen V.16 A se puede observar la presencia de fibras de colágeno más delgadas y menos densas que aquellas encontradas en los materiales con alginato. Se puede apreciar que el tejido conjuntivo se concentra abajo y/o arriba (flecha azul) de la herida, con menor presencia sobre los márgenes (flecha verde). Además, a mayor aumento, se encuentran vasos sanguíneos en menor número y calibre con respecto a HA y HA-E0.25, lo que implica una disminución en la vascularización del tejido circundante al hidrogel (Imagen V.16 B, flechas blancas). También, como en HA, este material presentó quebraduras o imperfecciones en el *scaffold*. Sin embargo, a pesar de haber sido colonizadas por células, no se observó la propagación de las mismas ni la formación de tejido fibroso apreciada en la matriz con alginato (Imagen V.16 A, flecha roja). Esto resulta congruente con los resultados obtenidos de manera *in vitro*, en los cuales concluimos que la incorporación del polímero natural a las redes de pHEMA favorece de manera significativa la regeneración del tejido.

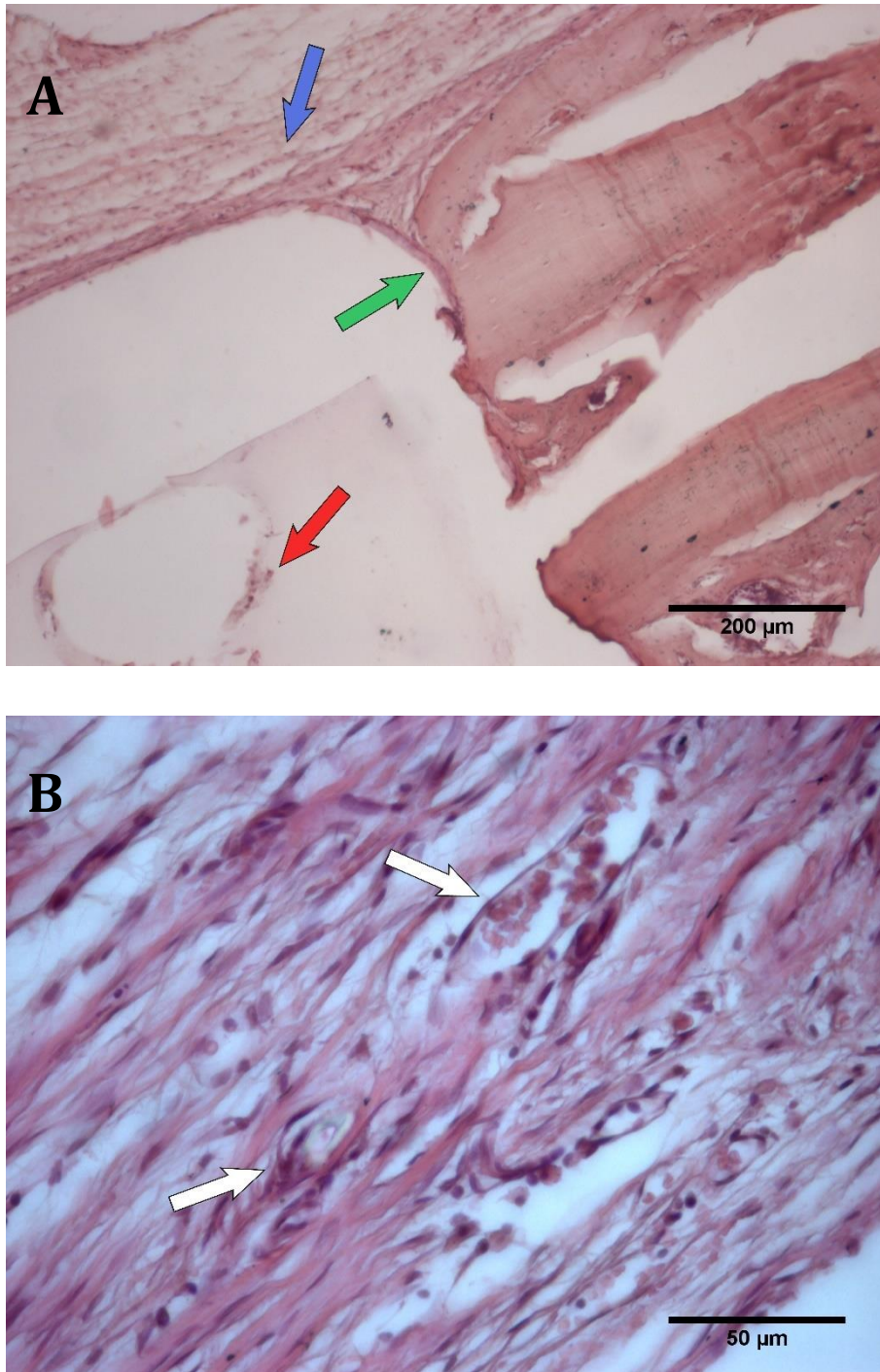


Imagen V.16. Micrografía del corte del defecto de pHEMA a A) 10X y B) 40X.

En el presente trabajo, y basándose sólo en el análisis histomorfométrico, la condición control mostró una mayor reosificación para una lesión con un tamaño crítico, luego de 30 días de cirugía. Sin embargo, el análisis histológico sí muestra resultados positivos en las heridas tratadas con los *scaffolds* con alginato debido a una buena estabilización de la lesión con presencia de un tejido conjuntivo denso y la formación de frentes de reosificación desde el margen correspondiente a las matrices. La mayor

desventaja de estos materiales se encuentra relacionada a su arquitectura y, por lo tanto, a la falta de porosidad en los mismos. Se ha demostrado que, cuando existe el espacio físico para hacerlo, las células buscan colonizar el hidrogel HA y secretan MEC.


Por lo tanto, nuestras observaciones respecto a la regeneración ósea sobre el defecto en la calota de ratas de HA y HA-E0.25 resultan prometedoras para la utilización de estos materiales en Ingeniería de Tejido Óseo, aunque sería conveniente modificar la arquitectura de los mismos para permitir una mayor osteoconducción.

V.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En conclusión, la incorporación del alginato en una red de HEMA-EGDMA proporcionó un material semi-interpenetrado (HA) con una mejora en su capacidad de hinchamiento mientras que, además, permitió estabilizar el fenotipo condrogénico en el tiempo, reduciendo su toxicidad. Al mismo tiempo, se demostró que estas propiedades pueden ser mejoradas no solo con la incorporación de alginato, sino que al variar las concentraciones de iniciador y entrecruzante se puede obtener una familia de redes semi-interpenetradas (HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.5) con propiedades versátiles.

En el estudio histomorfométrico de modelos óseos *in vivo* hallamos una menor reosificación de los defectos óseos con *scaffolds* con respecto a la condición control, lo cual podría deberse a la baja porosidad de los materiales obtenidos. Por otra parte, el análisis histológico demostró que la incorporación de alginato favorece la presencia de tejido conjuntivo denso y de buena calidad alrededor de los materiales, estabilizando así la herida. Además, no se encontraron evidencias de rechazo, demostrando la biocompatibilidad de los hidrogeles. En HA y HA-E0.25 se observó la estimulación de la regeneración ósea y la colonización por parte de células del tejido conectivo en zonas quebradas de HA.

Con un nuevo diseño que aumente la porosidad del material, estos resultados resultan muy alentadores para su aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo. Además, resultan tener un potencial prometedor para ser utilizados en regeneración de cartílago.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES GENERALES

IV. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis se utilizó alginato de sodio como material de partida para la síntesis de materiales que puedan ser utilizados en Ingeniería de Tejido Óseo y Cartilaginoso.

1. Se obtuvo alginato de sodio a partir de la nervadura y lámina del alga parda *Undaria pinnatífida* con un rendimiento razonable.

2. Las características fisicoquímicas (evaluadas por FTIR, RMN, TGA y viscosimetría) de los alginatos obtenidos fueron similares al compararlos con alginato comercial (Sigma Aldrich).

3. Mediante un método de purificación simple, se logró disminuir impurezas tales como proteínas y polifenoles de ambas fuentes de alginato analizados (alga parda y comercial) con tan solo una leve disminución en el peso molecular del polímero.

4. El análisis de citotoxicidad utilizando un modelo de macrófagos en cultivo (RAW 264.7) sembrados en presencia de los distintos alginatos, demostró que la purificación previene el efecto tóxico inicial de las muestras crudas.

5. Se observó que la proliferación y diferenciación de células progenitoras de médula ósea (CPMO) hacia el fenotipo osteoblástico fue favorecida con la purificación de las muestras de alginato.

6. Se sintetizaron hidrogeles de alginato entrecruzados iónicamente con estroncio. Estos resultaron poseer una gran capacidad de hinchamiento, una baja capacidad de retención de Sr^{+2} y una tasa de degradación muy alta luego de sólo 24 h. De esta forma, se demostró que la estabilidad de los hidrogeles obtenidos no resulta acorde a la aplicación buscada, ya que no fue posible obtener un sistema de liberación de droga adecuado.

7. Se desarrollaron biomateriales a partir de la síntesis de redes poliméricas de HEMA-EGDMA semi-interpenetradas (sIPN) con alginato. Se logró obtener una familia de sIPN con propiedades versátiles (HA, HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.25) y una matriz sin alginato (pHEMA) utilizada como condición control.

8. Se analizó la topografía de los *scaffolds* por SEM y se realizaron pruebas mecánicas, de hinchamiento, degradación y medidas de ángulo de contacto. Se encontraron materiales con porosidad baja, pero con mejoras en la capacidad de hinchamiento y degradabilidad debida a la incorporación de alginato a la matriz

polimérica. Además, se encontró que HA y HA-A0.5 presentaron propiedades mecánicas en el orden del tejido cartilaginoso.

9. Mediante estudios *in vitro*, se demostró la versatilidad de los hidrogeles, ya que permitieron la adhesión y proliferación de tres tipos celulares distintos (RAW 264.7, CPMO y condrocitos).

10. La evaluación de la capacidad osteogénica de los hidrogeles cultivados con CPMO demostró un aumento en la expresión de marcadores del fenotipo osteoblástico con respecto a las células crecidas en monocapa sobre el plato de cultivo estándar.

11. El estudio de los hidrogeles cultivados con condrocitos mostró que la incorporación de alginato favoreció el desarrollo condrogénico tanto con respecto a pHEMA como a las células crecidas en monocapa sobre el plato de cultivo estándar.

12. El análisis de la respuesta inmunogénica de los hidrogeles con RAW 264.7 sugirió que la incorporación del polisacárido a una red polimérica de HEMA-EGDMA previene un posible efecto citotóxico.

13. Se empleó un modelo *in vivo* para evaluar tres (pHEMA, HA y HA-E0.25) de los biomateriales desarrollados como sustitutos óseos, encontrando un porcentaje de reosificación y formación de tejido conjuntivo menor que la condición control (sin implante) debida a la baja degradabilidad de los *scaffolds*.

14. El análisis colorimétrico realizado con Picosirus red mostró la organización de tejido conjuntivo sano alrededor de las matrices, estabilizando la herida.

15. En la evaluación histológica realizada sobre los cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina no se evidenció rechazo del material, observándose la formación de tejido conjuntivo denso y frentes de reosificación en HA y HA-E0.25.

16. En HA se observaron grietas colonizadas por células del tejido conectivo con secreción de matriz extracelular (MEC)

En conjunto, estos resultados resultan muy prometedores en cuanto a la potencialidad de HA, HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.5 para ser utilizados como sustitutos biológicos en regeneración ósea y/o cartilaginosa.

CAPITULO VII: REFERENCIAS



REFERENCIAS

A

Agarwal, R., & Garcia, A. J. (2015). Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Advanced drug delivery reviews*, 94, 53-62.

Alfano, A. L., & Fernandez, J. M. (2015). Induction of Topographical Changes in Poly-ε-Caprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Biocompatibility and Cytotoxicity Evaluations. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 5(2), 142-149.

Anbinder, P. S., Peruzzo, P. J., & Amalvy, J. I. (2016). Effect of food additives on the microstructure, mechanical and water transport properties of polyurethane films. *Progress in Organic Coatings*, 101, 207-215.

Annabi, N., Nichol, J. W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khademhosseini, A., & Dehghani, F. (2010). Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(4), 371-383.

Apoya, M., Ogawa, H., & Nanba, N. (2002). Alginate content of farmed *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar from the three bays of Iwate, Japan during harvest period. *Botanica marina*, 45(5), 445-452.

Armiento, A. R., Stoddart, M. J., Alini, M., & Eglin, D. (2018). Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta biomaterialia*, 65, 1-20.

Arvizu Higuera, D. L. (1993). *Optimización del proceso de extracción de alginato de sodio, a partir del alga café Macrocystis pyrifera* (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).

Athanasidou, K. A., Darling, E. M., & Hu, J. C. (2009). Articular cartilage tissue engineering. *Synthesis Lectures on Tissue Engineering*, 1(1), 1-182.

Atkins, G. J., Welldon, K. J., Halbout, P., & Findlay, D. M. (2009). Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporosis International*, 20(4), 653-664.

Augst, A. D., Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular bioscience*, 6(8), 623-633.

B

Bajpai, A. K., & Shrivastava, M. (2002). Enhanced water sorption of a semi-interpenetrating polymer network (IPN) of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)(PHEMA) and poly (ethylene glycol)(PEG). *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 39(7), 667-692.

Bajpai, A. K., Bajpai, J., & Shukla, S. (2002). Water sorption through a semi-interpenetrating polymer network (IPN) with hydrophilic and hydrophobic chains. *Reactive and Functional Polymers*, 50(1), 9-21.

Bajpai, M., Shukla, P., & Bajpai, S. K. (2016). Ca (II)+ Ba (II) ions crosslinked alginate gels prepared by a novel diffusion through dialysis tube (DTDT) approach and preliminary BSA release study. *Polymer Degradation and Stability*, 134, 22-29.

Bajpai, S. K., & Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59(2), 129-140.

Bard, J. B., & Chapman, J. A. (1973). Diameters of collagen fibrils grown *in vitro*. *Nature New Biology*, 246(151), 83.

Barui, A. (2018). Synthetic polymeric gel. In *Polymeric Gels* (pp. 55-90). Woodhead Publishing.

Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin*, 87(1), 77-95.

Bi, X., Han, L., Qu, T., Mu, Y., Guan, P., Qu, X., ... & Huang, X. (2017). Anti-inflammatory effects, SAR, and action mechanism of monoterpenoids from radix paeoniae Alba on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Molecules*, 22(5), 715.

Bobacz, K., Erlacher, L., Smolen, J., Soleiman, A., & Graninger, W. B. (2004). Chondrocyte number and proteoglycan synthesis in the aging and osteoarthritic human articular cartilage. *Annals of the rheumatic diseases*, 63(12), 1618-1622.

Bobick, B. E., & Kulyk, W. M. (2008). Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 84(2), 131-154.

Bonnelye, E., Chabadel, A., Saltel, F., & Jurdic, P. (2008). Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*. *Bone*, 42(1), 129-138.

Bose, S., & Bandyopadhyay, A. (2013). Introduction to biomaterials. In *Characterization of Biomaterials* (pp. 1-9). Academic Press.

Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 30(10), 546-554.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Buckwalter, J. A. (1991). Articular cartilage: composition and structure. *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*.

Buckwalter, J. A., & Mankin, H. J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures*, 47, 477-486.

Burr, D. B. (2004). Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 12, 20-30.

C

Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P., & Quarto, R. (2003). Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*, 22(1), 81-91.

Capulli, M., Paone, R., & Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, 3-12.

Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., & Rodeo, S. A. (2017). Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in sports medicine*, 36(3), 413-425.

Carrow, J. K., & Gaharwar, A. K. (2015). Bioinspired polymeric nanocomposites for regenerative medicine. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 216(3), 248-264.

Casas, G. N., & Piriz, M. L. (1996). Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. *Hydrobiologia*, 326(1), 213-215.

Caverzasio, J. (2008). Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone*, 42(6), 1131-1136.

Chattopadhyay, N., Quinn, S. J., Kifor, O., Ye, C., & Brown, E. M. (2007). The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochemical pharmacology*, 74(3), 438-447.

Chen, C. H., Wang, F. Y., Mao, C. F., Liao, W. T., & Hsieh, C. D. (2008). Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(1), 37-42.

Chiang, H., & Jiang, C. C. (2009). Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *Journal of the Formosan Medical Association*, 108(2), 87-101.

Chivukula, P., Dušek, K., Wang, D., Dušková-Smrčková, M., Kopečková, P., & Kopeček, J. (2006). Synthesis and characterization of novel aromatic azo bond-containing pH-sensitive and hydrolytically cleavable IPN hydrogels. *Biomaterials*, 27(7), 1140-1151.

Clair, B. L., Johnson, A. R., & Howard, T. (2009). Cartilage repair: current and emerging options in treatment. *Foot & ankle specialist*, 2(4), 179-188.

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3 (Supplement 3), S131-S139.

Cooper, A. (1970). Thermodynamic studies of the assembly *in vitro* of native collagen fibrils. *Biochemical journal*, 118(3), 355-365.

Cooper, C., Reginster, J. Y., Chapurlat, R., Christiansen, C., Genant, H., Bellamy, N., ... & Chevalier, X. (2012). Efficacy and safety of oral strontium ranelate for the treatment of knee osteoarthritis: rationale and design of randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Current medical research and opinion*, 28(2), 231-239.

Cortizo, A. M., Ruderman, G., Correa, G., Mogilner, I. G., & Tolosa, E. J. (2012). Effect of surface topography of collagen scaffolds on cytotoxicity and osteoblast differentiation. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2(2), 125-132.

Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(2), 123-133.

Coulombe, J., Faure, H., Robin, B., & Ruat, M. (2004). *In vitro* effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(4), 1184-1190.

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of controlled release*, 119(1), 5-24.

D

Dalle Carbonare, L., Innamorati, G., & Valenti, M. T. (2012). Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3), 891-897.

De Crombrughe, B., Lefebvre, V., Behringer, R. R., Bi, W., Murakami, S., & Huang, W. (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biology*, 19(5), 389-394.

De Vos, P., De Haan, B., & Van Schilfgaarde, R. (1997). Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules. *Biomaterials*, 18(3), 273-278.

Dellatorre, F. G., Amoroso, R. O., Saravia, J., & Orensanz, J. M. (2014). Rapid expansion and potential range of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in the southwestern Atlantic.

Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Mallein-Gerin, F., Legendre, F., & Galera, P. (2014). Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(8), 2414-2440.

Denlinger, L. C., Fiset, P. L., Garis, K. A., Kwon, G., Vazquez-Torres, A., Simon, A. D., ... & Corbett, J. A. (1996). Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 337-342.

Deschaseaux, F., Sensébé, L., & Heymann, D. (2009). Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends in molecular medicine*, 15(9), 417-429.

Díez Peña, E. (2004). *Desarrollo y caracterización de hidrogeles poliméricos con aplicación en la liberación controlada de fármacos*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.

Dolcimascolo, A., Calabrese, G., Conoci, S., & Parenti, R. (2019). Innovative Biomaterials for Tissue Engineering. In *Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration*. IntechOpen.

Dragan, E. S. (2014). Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chemical Engineering Journal*, 243, 572-590.

Draget, K. I. (2009). Alginates. In *Handbook of hydrocolloids* (pp. 807-828). Woodhead Publishing.

Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351.

Dubey, N. K., & Deng, W. P. (2018). Polymeric gels for cartilage tissue engineering. In *Polymeric Gels* (pp. 505-525). Woodhead Publishing.

Duplomb, L., Dagouassat, M., Jourdon, P., & Heymann, D. (2007). Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem cells*, 25(3), 544-552.

Dušek, K., Bohdanecký, M., & Vošický, V. (1977). Solubilization of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) with aqueous salt solutions; Swelling of gels. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 42(5), 1599-1614.

Dusseault, J., Tam, S. K., Ménard, M., Polizu, S., Jourdan, G., Yahia, L. H., & Hallé, J. P. (2006). Evaluation of alginate purification methods: effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 76(2), 243-251.

Duvivier-Kali, V. F., Omer, A., Parent, R. J., O'Neil, J. J., & Weir, G. C. (2001). Complete protection of islets against allojection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. *Diabetes*, 50(8), 1698-1705.

E

Escalona, M. H., Rubio, G. Y. L., & Padilla, A. G. (2005). Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como superabsorbente. *Revista Cubana de Química*, 17(3), 239-240.

Espevik, T., Otterlei, M., Skjåk-Braek, G., Ryan, L., Wright, S. D., & Sundan, A. (1993). The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers. *European journal of immunology*, 23(1), 255-261.

Ethier, C. R., & Simmons, C. A. (2007). *Introductory biomechanics: from cells to organisms*. Cambridge University Press.

European Medicines Agency (EMA) (2013). Recommendation to restrict the use of Protelos/ Osseor (strontium ranelate). *Press release*.

Eyras, M. C., & Sar, E. A. (2003). Arribazones estivales en Puerto Madryn, Argentina, como materiales para la obtención de compost. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 38(1-2).

F

Fakhry, M., Hamade, E., Badran, B., Buchet, R., & Magne, D. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World journal of stem cells*, 5(4), 136.

Fernández, J. M., Cortizo, M. S., & Cortizo, A. M. (2014). Fumarate/ceramic composite based scaffolds for tissue engineering: evaluation of hydrophilicity, degradability, toxicity and biocompatibility. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 4(3), 227-234.

Fernández, J. M., Cortizo, M. S., Cortizo, A. M., & Abraham, G. A. (2011). Osteoblast behavior on novel porous polymeric scaffolds. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 1(1), 86-92.

Fernandez, J. M., Molinuevo, M. S., Cortizo, A. M., McCarthy, A. D., & Cortizo, M. S. (2010). Characterization of poly (ϵ -caprolactone)/Polyfumarate blends as scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 21(10), 1297-1312.

Fernández, J. M., Molinuevo, M. S., McCarthy, A. D., & Cortizo, A. M. (2014 b). Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn 2+ and Mg 2+. *Biometals*, 27(3), 601-607.

Fernández, J. M., Molinuevo, M. S., Sedlinsky, C., Schurman, L., Cortizo, A. M., & McCarthy, A. D. (2013). Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. *European journal of pharmacology*, 706(1-3), 41-47.

Fertah, M., Belfkira, A., Taourirte, M., & Brouillette, F. (2014). Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3707-S3714.

Flannery, C. R., Hughes, C. E., Schumacher, B. L., Tudor, D., Aydelotte, M. B., Kuettner, K. E., & Caterson, B. (1999). Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 254(3), 535-541.

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015.

Fratzl, P., Gupta, H. S., Paschalis, E. P., & Roschger, P. (2004). Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *Journal of materials chemistry*, 14(14), 2115-2123.

Furuya, D. C., Costa, S. A. D., Oliveira, R. C. D., Ferraz, H. G., Pessoa Junior, A., & Costa, S. M. D. (2017). Fibers obtained from alginate, chitosan and hybrid used in the development of scaffolds. *Materials Research*, 20(2), 377-386.

G

Ganji, F., Vasheghani, F. S., & Vasheghani, F. E. (2010). Theoretical description of hydrogel swelling: a review.

Geneser F. (2006). *Histología sobre bases moleculares*. Buenos Aires, Médica Panamericana. 3ra. Edición.

George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of controlled release*, 114(1), 1-14.

Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, 36(3), S20-S27.

Gikas, P. D., Morris, T., Carrington, R., Skinner, J., Bentley, G., & Briggs, T. (2009). A correlation between the timing of biopsy after autologous chondrocyte implantation and the histological appearance. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 91(9), 1172-1177.

Gomes, M. E., & Reis, R. L. (2004). Tissue engineering: key elements and some trends. *Macromolecular bioscience*, 4(8), 737-742.

Gomes, M. E., Azevedo, H. S., Moreira, A. R., Ellä, V., Kellomäki, M., & Reis, R. L. (2008). Starch–poly (ϵ -caprolactone) and starch–poly (lactic acid) fibre-mesh scaffolds for bone tissue engineering applications: structure, mechanical properties and degradation behaviour. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(5), 243-252.

Gomes, P. S., & Fernandes, M. H. (2011). Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory animals*, 45(1), 14-24.

Gomez, C. G., Lambrecht, M. V. P., Lozano, J. E., Rinaudo, M., & Villar, M. A. (2009). Influence of the extraction–purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(4), 365-371.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS letters*, 32(1), 195-198.

Grasdalen, H. (1983). High-field, 1H-nmr spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research*, 118, 255-260.

Grasdalen, H., Larsen, B., & Smidsrød, O. (1979). A pmr study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydrate Research*, 68(1), 23-31.

Grillo, C. A., Reigosa, M. A. & Fernandez Lorenzo M. A. (2010). Does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells?. *Contraception*, 81(4), 343-349.

Gründer, T., Gaissmaier, C., Fritz, J., Stoop, R., Hortschansky, P., Mollenhauer, J., & Aicher, W. K. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis and cartilage*, 12(7), 559-567.

Gunatillake, P. A., & Adhikari, R. (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 5(1), 1-16.

H

Hamdy, N. A. (2009). Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. *Rheumatology*, 48(suppl_4), iv9-iv13.

Hangody, L., Vásárhelyi, G., Hangody, L. R., Sükösd, Z., Tibay, G., Bartha, L., & Bodó, G. (2008). Autologous osteochondral grafting—technique and long-term results. *Injury*, 39(1), 32-39.

Hankenson, K. D., Dishowitz, M., Gray, C., & Schenker, M. (2011). Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*, 42(6), 556-561.

Hanks, C. T., Wataha, J. C., & Sun, Z. (1996). *In vitro* models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*, 12(3), 186-193.

Haug, A. (1964). Composition and properties of alginates.

Haug, A., Myklestad, S., Larsen, B., & Smidsrød, O. (1967). Correlation between chemical structure and physical properties of alginates. *Acta Chem Scand*, 21(3), 768-78.

He, W., & Andersson, M. (2017). Biomimetic Synthesis of Nanostructured Calcium Phosphates. *Frontiers in Nanobiomedical Research. Singapore: The World Scientific Encyclopedia of Nanomedicine and Bioengineering II*, 85-124.

Hoare, T. R., & Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993-2007.

Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 18-23.

Hu, J. (2005). Chondrocyte self-assembly and culture in bioreactors (*Doctoral dissertation, Rice University*).

Hunziker, E. B. (1999). Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7(1), 15-28.

Hurtel-Lemaire, A. S., Mentaverri, R., Caudrillier, A., Cournarie, F., Wattel, A., Kamel, S., ... & Brazier, M. (2009). The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis new insights into the associated signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 575-584.

Hutchison, C., Pilote, M., & Roy, S. (2007). The axolotl limb: a model for bone development, regeneration and fracture healing. *Bone*, 40(1), 45-56.

Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. In *The biomaterials: Silver jubilee compendium* (pp. 175-189). Elsevier Science.

I

Igarashi, T., Iwasaki, N., Kasahara, Y., & Minami, A. (2010). A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94(3), 844-855.

Indergaard, M., Skjåk-Bræk, G., & Jensen, A. (1990). Studies on the influence of nutrients on the composition and structure of alginate in *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. (Laminariales, Phaeophyceae). *Botanica Marina*, 33(3), 277-288.

International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society, ICRS (<http://cartilage.org>)

Irigoyen, A. J., Trobbiani, G., Sgarlatta, M. P., & Raffo, M. P. (2011). Effects of the alien algae *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the diversity and abundance of benthic macrofauna in Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina): potential implications for local food webs. *Biological Invasions*, 13(7), 1521-1532.

Iwamoto, M., Kurachi, M., Nakashima, T., Kim, D., Yamaguchi, K., Oda, T., ... & Muramatsu, T. (2005). Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264. 7 cells. *FEBS letters*, 579(20), 4423-4429.

J

Jeuken, R., Roth, A., Peters, R., van Donkelaar, C., Thies, J., van Rhijn, L., & Emans, P. (2016). Polymers in cartilage defect repair of the knee: current status and future prospects. *Polymers*, 8(6), 219.

Jork, A., Thürmer, F., Cramer, H., Zimmermann, G., Gessner, P., Hämel, K., ... & Fritsch, K. G. (2000). Biocompatible alginate from freshly collected *Laminaria pallida* for implantation. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(2), 224-229.

Jung, C. K. (2014). Articular Cartilage: Histology and Physiology. In *Techniques in Cartilage Repair Surgery* (pp. 17-21). Springer, Berlin, Heidelberg.

Junqueira, L. C. U., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*, 11(4), 447-455.

K

Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491.

Karsenty, G., & Wagner, E. F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell*, 2(4), 389-406.

Kawano, K., Kantak, S. S., Murai, M., Yao, C. C., & Kramer, R. H. (2001). Integrin $\alpha3\beta1$ engagement disrupts intercellular adhesion. *Experimental cell research*, 262(2), 180-196.

Khan, F., & Tanaka, M. (2018). Designing smart biomaterials for tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 17.

Khan, F., Valere, S., Fuhrmann, S., Arrighi, V., & Bradley, M. (2013). Synthesis and cellular compatibility of multi-block biodegradable poly (ϵ -caprolactone)-based polyurethanes. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(20), 2590-2600.

Khosla, S., Oursler, M. J., & Monroe, D. G. (2012). Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(11), 576-581.

Kim, S. J., Yoon, S. G., & Kim, S. I. (2004). Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogels composed of alginate and poly (diallyldimethylammonium chloride). *Journal of Applied Polymer Science*, 91(6), 3705-3709.

Kim, Y. W., Kim, J. E., Jung, Y., & Sun, J. Y. (2019). Non-swellable, cytocompatible pHEMA-alginate hydrogels with high stiffness and toughness. *Materials Science and Engineering: C*, 95, 86-94.

Kobayashi, S., Takahashi, H. E., Ito, A., Saito, N., Nawata, M., Horiuchi, H., ... & Takaoka, K. (2003). Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone*, 32(2), 163-169.

Kost, J., & Langer, R. (2012). Responsive polymeric delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 327-341.

Kostenuik, P. (2013). On the evolution and contemporary roles of bone remodeling. In *Osteoporosis* (pp. 873-914). Academic Press.

Krajewska-Włodarczyk, M., Owczarczyk-Saczonek, A., Placek, W., Osowski, A., & Wojtkiewicz, J. (2018). Articular cartilage aging-potential regenerative capacities of cell manipulation and stem cell therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 623.

Kretlow, J. D., & Mikos, A. G. (2007). Mineralization of synthetic polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue engineering*, 13(5), 927-938.

Kulseng, B., Skjåk-Bræk, G., Ryan, L., Andersson, A., King, A., Faxvaag, A., & Espevik, T. (1999). TRANSPLANTATION OF ALGINATE MICROCAPSULES: Generation of Antibodies Against Alginates and Encapsulated Porcine Islet-Like Cell Clusters1. *Transplantation*, 67(7), 978-984.

Kuo, C. K., & Ma, P. X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), 511-521.

Kurachi, M., Nakashima, T., Yamaguchi, K., Oda, T., Miyajima, C., Iwamoto, Y., & Muramatsu, T. (2005). Comparison of the activities of various alginates to induce TNF- α secretion in RAW264. 7 cells. *Journal of infection and chemotherapy*, 11(4), 199-203.

Kuznetsova, N., Chi, S. L., & Leikin, S. (1998). Sugars and polyols inhibit fibrillogenesis of type I collagen by disrupting hydrogen-bonded water bridges between the helices. *Biochemistry*, 37(34), 11888-11895.

L

La Gatta, A., Schiraldi, C., Esposito, A., D'Agostino, A., & De Rosa, A. (2009). Novel poly (HEMA-co-METAC)/alginate semi-interpenetrating hydrogels for biomedical applications: Synthesis and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 90(1), 292-302.

Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *NATURE-LONDON-*, 5-10.

Langer, R. (2000). Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research*, 33(2), 94-101.

Langer, R. S., & Vacanti, J. P. (1999). Tissue engineering: the challenges ahead. *Scientific American*, 280(4), 86-89.

Langer, R., & Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260, 920-926

Lanza, R., Langer, R., & Vacanti, J. P. (Eds.). (2011). *Principles of tissue engineering*. Academic press.

Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., Blaszczyk-Lezak, I., Mijangos, C., & Cortizo, M. S. (2018). Nanostructured fumarate copolymer-chitosan crosslinked scaffold: An *in vitro*

osteocondrogenesis regeneration study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(2), 570-579.

Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K., & Changotade, S. (2014). Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 751-758.

Lee, D. A., Reisler, T., & Bader, D. L. (2003). Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 74(1), 6-15.

Lee, J., & Lee, K. Y. (2009). Local and sustained vascular endothelial growth factor delivery for angiogenesis using an injectable system. *Pharmaceutical research*, 26(7), 1739-1744.

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*, 101(7), 1869-1880.

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.

Lee, K. Y., Alsberg, E., & Mooney, D. J. (2001). Degradable and injectable poly (aldehyde guluronate) hydrogels for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 56(2), 228-233.

Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir, K. H., & Mooney, D. J. (2000). Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules*, 33(11), 4291-4294.

Li, L., Yu, F., Zheng, L., Wang, R., Yan, W., Wang, Z., ... & Wang, X. (2019). Natural hydrogels for cartilage regeneration: modification, preparation and application. *Journal of orthopaedic translation*, 17, 26-41.

Li, Y., Chen, S. K., Li, L., Qin, L., Wang, X. L., & Lai, Y. X. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of orthopaedic translation*, 3(3), 95-104.

Liebschner, M. A. (2004). Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, 25(9), 1697-1714.

Liu, R., Schindeler, A., & Little, D. G. (2010). The potential role of muscle in bone repair. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 10(1), 71-6.

Liu, Y., Zhang, C. J., Zhao, J. C., Guo, Y., Zhu, P., & Wang, D. Y. (2016). Bio-based barium alginate film: Preparation, flame retardancy and thermal degradation behavior. *Carbohydrate polymers*, 139, 106-114.

Llabot, J. M., Manzo, R. H., & Allemandi, D. A. (2004). Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *International journal of pharmaceuticals*, 276(1-2), 59-66.

Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 485-502.

Lowenstein, C. J., & Padalko, E. (2004). iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of cell science*, 117(14), 2865-2867.

Lu, L., Zhu, X., Valenzuela, R. G., Currier, B. L., & Yaszemski, M. J. (2001). Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®], 391, S251-S270.

M

Mabilleau, G., Moreau, M. F., Filmon, R., Baslé, M. F., & Chappard, D. (2004). Biodegradability of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) in the presence of the J774. 2 macrophage cell line. *Biomaterials*, 25(21), 5155-5162.

Makris, E. A., Gomoll, A. H., Malizos, K. N., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2015). Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(1), 21.

Malafaya, P. B., Silva, G. A., & Reis, R. L. (2002). Drug delivery therapies I: general trends and its importance on bone tissue engineering applications.

Mandal, B., & Ray, S. K. (2013). Synthesis of interpenetrating network hydrogel from poly (acrylic acid-co-hydroxyethyl methacrylate) and sodium alginate: modeling and kinetics study for removal of synthetic dyes from water. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 257-269.

Mano, J. F., & Reis, R. L. (2007). Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(4), 261-273.

Marie, P. J. (2008). Effective doses for strontium ranelate. *Osteoporosis international*, 19(12), 1813-1813.

Marlovits, S., Aldrian, S., Wondrasch, B., Zak, L., Albrecht, C., Welsch, G., & Trattnig, S. (2012). Clinical and radiological outcomes 5 years after matrix-induced autologous chondrocyte implantation in patients with symptomatic, traumatic chondral defects. *The American journal of sports medicine*, 40(10), 2273-2280.

Martin, J. P., & Cuevas, J. M. (2006). First record of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Southern Patagonia, Argentina. *Biological Invasions*, 8(6), 1399.

Martini, F. H., Timmons, M. J., & Tallitsch, R. B. (2009). Human anatomy 6th ed.

Mazué, G., Newman, A. J., Scampini, G., Torre, P. D., Hard, G. C., Iatropoulos, M. J., ... & Bagnasco, S. M. (1993). The histopathology of kidney changes in rats and monkeys following intravenous administration of massive doses of FCE 26184, human basic fibroblast growth factor. *Toxicologic pathology*, 21(5), 490-501.

McGovern, J. A., Griffin, M., & Hutmacher, D. W. (2018). Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease models & mechanisms*, 11(4), dmm033084.

Menzies, K. L., & Jones, L. (2010). The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optometry and Vision Science*, 87(6), 387-399.

Meunier, P. J., Roux, C., Seeman, E., Ortolani, S., Badurski, J. E., Spector, T. D., ... & Rizzoli, R. (2004). The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 350(5), 459-468.

Mohan, Y. M., Murthy, P. K., & Raju, K. M. (2005). Synthesis, characterization and effect of reaction parameters on swelling properties of acrylamide-sodium methacrylate superabsorbent copolymers. *Reactive and Functional Polymers*, 63(1), 11-26.

Moisio, K., Eckstein, F., Chmiel, J. S., Guerhazi, A., Prasad, P., Almagor, O., Song, J., Dunlop, D., Hudelmaier, M., Kothari, A., & Sharma, L. (2009). Denuded subchondral bone and knee pain in persons with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 60(12), 3703-3710.

Molinuevo, M. S., Fernández, J. M., Cortizo, A. M., McCarthy, A. D., Schurman, L., & Sedlinsky, C. (2017). Advanced glycation end products and strontium ranelate promote osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells *in vitro*: Preventive role of vitamin D. *Molecular and cellular endocrinology*, 450, 94-104.

Molinuevo, M. S., Schurman, L., McCarthy, A. D., Cortizo, A. M., Tolosa, M. J., Gangoiti, M. V., ... & Sedlinsky, C. (2010). Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: *in vivo* and *in vitro* studies. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(2), 211-221.

Mørch, Ý. A., Donati, I., Strand, B. L., & Skjåk-Bræk, G. (2006). Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, 7(5), 1471-1480.

Mountziaris, P. M., & Mikos, A. G. (2008). Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(2), 179-186.

Murphy, C. L., & Sambanis, A. (2001). Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue engineering*, 7(6), 791-803.

Mystkowska, J., Mazurek-Budzyńska, M., Piktel, E., Niemirowicz, K., Karalus, W., Deptuła, P., ... & Bucki, R. (2017). Assessment of aliphatic poly (ester-carbonate-urea-urethane) s potential as materials for biomedical application. *Journal of Polymer Research*, 24(9), 144.

Myung, D., Waters, D., Wiseman, M., Duhamel, P. E., Noolandi, J., Ta, C. N., & Frank, C. W. (2008). Progress in the development of interpenetrating polymer network hydrogels. *Polymers for advanced technologies*, 19(6), 647-657.

N

Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2005). Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. In *Tissue engineering I* (pp. 47-90). Springer, Berlin, Heidelberg.

National Research Council. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press.

O

Ofek, G., & Athanasiou, K. (2007). Micromechanical properties of chondrocytes and chondrons: relevance to articular cartilage tissue engineering. *Journal of Mechanics of Materials and Structures*, 2(6), 1059-1086.

Omer, A., Duvivier-Kali, V., Fernandes, J., Tchipashvili, V., Colton, C. K., & Weir, G. C. (2005). Long-term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets. *Transplantation*, 79(1), 52-58.

Orive, G., Ponce, S., Hernandez, R. M., Gascon, A. R., Igartua, M., & Pedraz, J. L. (2002). Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, 23(18), 3825-3831.

Orive, G., Tam, S. K., Pedraz, J. L., & Hallé, J. P. (2006). Biocompatibility of alginate–poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials*, 27(20), 3691-3700.

Otterlei, M., Ostgaard, K., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P., & Espevik, T. (1991). Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *Journal of immunotherapy: official journal of the Society for Biological Therapy*, 10(4), 286-291.

P

Panseri, S., Russo, A., Cunha, C., Bondi, A., Di Martino, A., Patella, S., & Kon, E. (2012). Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 20(6), 1182-1191.

Park, J., & Lakes, R. S. (2007). *Biomaterials: an introduction*. Springer Science & Business Media.

Pedersen, A. (1984). Studies on phenol content and heavy metal uptake in fucoids. In *Eleventh International Seaweed Symposium* (pp. 498-504). Springer, Dordrecht.

Pedersen, R. A. (1999). Embryonic stem cells for medicine. *Scientific American*, 280(4), 68-73.

Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B. G., ... & Richter, W. (2006). Premature induction of hypertrophy during *in vitro* chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 54(10), 3254-3266.

Peppas, N. A. (1997). Hydrogels and drug delivery. *Current opinion in colloid & interface science*, 2(5), 531-537.

Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. S., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 50(1), 27-46.

Piriz, M. L., Eyra, M. C., & Rostagno, C. M. (2003). Changes in biomass and botanical composition of beach-cast seaweeds in a disturbed coastal area from Argentine Patagonia. *Journal of Applied Phycology*, 15(1), 67-74.

Porter, J. R., Ruckh, T. T., & Popat, K. C. (2009). Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology progress*, 25(6), 1539-1560.

Potier, E., Noailly, J., & Ito, K. (2010). Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. *Journal of biomechanics*, 43(5), 807-817.

Prokop, A., & Wang, T. G. (1997). Purification of polymers used for fabrication of an immunoisolation barrier. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 831, 223-231.

Q

Qi, Y., Lu, L. U., Zhou, C., & Luo, B. (2009). Purification of alginate for tissue engineering. In *2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 1-4). IEEE.

Qiu, W., Murray, M. M., Shortkroff, S., Lee, C. R., Martin, S. D., & Spector, M. (2000). Outgrowth of chondrocytes from human articular cartilage explants and expression of α -smooth muscle actin. *Wound Repair and Regeneration*, 8(5), 383-391.

Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., & Wenstrup, R. J. (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An *in vitro* model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(6), 683-692.

R

Rao, K. M., Rao, K. K., Sudhakar, P., Rao, K. C., & Subha, M. C. S. (2013). Synthesis and Characterization of biodegradable Poly (Vinyl caprolactam) grafted on to sodium alginate and its microgels for controlled release studies of an anticancer drug. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(06), 061-069.

Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., & Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15(1), 261-267.

Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Elsevier.

Reginster, J. Y., Seeman, E., De Vernejoul, M. C., Adami, S., Compston, J., Phenekos, C., ... & Sorensen, O. H. (2005). Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 90(5), 2816-2822.

Revell, C. M., & Athanasiou, K. A. (2008). Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 15(1), 1-15.

Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413-3431.

Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled release*, 5(1), 37-42.

Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of controlled release*, 5(1), 23-36.

Rose, F. R., & Oreffo, R. O. (2002). Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(1), 1-7.

Ross, M., & Pawlina, W. (2017). *Histology, A text and atlas, with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Roth, V., & Mow, V. C. (1980). The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 62(7), 1102-1117.

Rouwkema, J., Gibbs, S., Lutolf, M. P., Martin, I., Vunjak-Novakovic, G., & Malda, J. (2011). *In vitro* platforms for tissue engineering: implications for basic research and clinical translation. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5(8), e164-e167.

S

Sabino, M. A., Albuérne, J., Müller, A. J., Brisson, J., & Prud'homme, R. E. (2004). Influence of *in vitro* hydrolytic degradation on the morphology and crystallization behavior of poly (p-dioxanone). *Biomacromolecules*, 5(2), 358-370.

Samavedi, S., Poindexter, L. K., Van Dyke, M., & Goldstein, A. S. (2014). Synthetic biomaterials for regenerative medicine applications. In *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation* (pp. 81-99). Academic Press.

Sanzana, E. S., Navarro, M., Ginebra, M. P., Planell, J. A., Ojeda, A. C., & Montecinos, H. A. (2014). Role of porosity and pore architecture in the *in vivo* bone regeneration capacity of biodegradable glass scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(6), 1767-1773.

Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., ... & Noda, M. (2000). SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10738-10744.

Sgaglione, N. A., Miniaci, A., Gillogly, S. D., & Carter, T. R. (2002). Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 18(2), 9-32.

Shalak, R.; Fox C.P. (1988). "Preface" *Tissue Engineering*. Shalak, R.; Fox, C.P. (eds). New York: Alan R. Liss, 26-29.

Silber, J. S., Anderson, D. G., Daffner, S. D., Brislin, B. T., Leland, J. M., Hilibrand, A. S., ... & Albert, T. J. (2003). Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine*, 28(2), 134-139.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.

Skjåk-Bræk, G., Grasdalen, H., & Smidsrød, O. (1989). Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydrate polymers*, 10(1), 31-54.

Skriptsova, A., Khomenko, V., & Isakov, V. (2004). Seasonal changes in growth rate, morphology and alginate content in *Undaria pinnatifida* at the northern limit in the Sea of Japan (Russia). *Journal of Applied Phycology*, 16(1), 17.

Smidsrød, O. (1974). Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday discussions of the Chemical Society*, 57, 263-274.

Smidsrød, O., Glover, R. M., & Whittington, S. G. (1973). The relative extension of alginates having different chemical composition. *Carbohydrate research*, 27(1), 107-118.

Soares, J. D. P., Santos, J. E., Chierice, G. O., & Cavaleiro, E. T. G. (2004). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, 29(2), 57-64.

Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F. P., Villa, A., & Helfrich, M. H. (2013). Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(9), 522.

Solheim, E., Hegna, J., Øyen, J., Austgulen, O. K., Harlem, T., & Strand, T. (2010). Osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee: results at 5 to 9 years. *The Knee*, 17(1), 84-87.

Sornkamnerd, S., Okajima, M. K., & Kaneko, T. (2017). Tough and porous hydrogels prepared by simple lyophilization of LC gels. *ACS Omega*, 2(8), 5304-5314.

Spencer, N. D., Gimble, J. M., & Lopez, M. J. (2011). Mesenchymal stromal cells: past, present, and future. *Veterinary Surgery*, 40(2), 129-139.

Sperling, L. H. (1994). Interpenetrating polymer networks: an overview.

Sperling, L. H. (2005). *Introduction to physical polymer science*. John Wiley & Sons.

Stevens, M. M., Qanadilo, H. F., Langer, R., & Shastri, V. P. (2004). A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 25(5), 887-894.

Stokke, B. T., Draget, K. I., Smidsrød, O., Yuguchi, Y., Urakawa, H., & Kajiwara, K. (2000). Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 1. Ca- alginate gels. *Macromolecules*, 33(5), 1853-1863.

Stolzing, A., & Scutt, A. (2006). Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging cell*, 5(3), 213-224.

Strontium ranelate discontinued (2017). *Drug and Therapeutics Bulletin*, 55(8), 86.1-86.

T

Tam, S. K., Dusseault, J., Bilodeau, S., Langlois, G., Hallé, J. P., & Yahia, L. H. (2011). Factors influencing alginate gel biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 98(1), 40-52.

Teixeira, C. C., Agoston, H., & Beier, F. (2008). Nitric oxide, C-type natriuretic peptide and cGMP as regulators of endochondral ossification. *Developmental biology*, 319(2), 171-178.

Thompson, E. M., Matsiko, A., Farrell, E., Kelly, D. J., & O'Brien, F. J. (2015). Recapitulating endochondral ossification: a promising route to *in vivo* bone regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(8), 889-902.

Tomić, S. L., Mičić, M. M., Dobić, S. N., Filipović, J. M., & Suljovrujić, E. H. (2010). Smart poly (2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) hydrogels for biomedical application. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(5), 643-649.

Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(6), 621-630.

Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Essentials of anatomy and physiology*. Wiley.

Tullberg-Reinert, H., & Jundt, G. (1999). In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochemistry and cell biology*, 112(4), 271-276.

U

Uchegbu, I. F., & Schatzlein, A. G. (2006). *Polymers in drug delivery*. CRC Press.

Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews*, 99(11), 3181-3198.

Upman, P. J. (2006). ISO 10993-6: Test for local effects after implantation. *BONEZone*, 5(1), 50-52.

V

Valente, J. F. A., Valente, T. A. M., Alves, P., Ferreira, P., Silva, A., & Correia, I. J. (2012). Alginate based scaffolds for bone tissue engineering. *Materials science and engineering: C*, 32(8), 2596-2603.

Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K. H., & Kim, S. K. (2015). Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International journal of biological macromolecules*, 72, 269-281.

Vinatier, C., & Guicheux, J. (2016). Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Annals of physical and rehabilitation medicine*, 59(3), 139-144.

Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., & Noël, D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in biotechnology*, 27(5), 307-314.

W

Wang, J., Wu, W., & Lin, Z. (2008). Kinetics and thermodynamics of the water sorption of 2-hydroxyethyl methacrylate/styrene copolymer hydrogels. *Journal of applied polymer science*, 109(5), 3018-3023.

Wang, L., Shelton, R. M., Cooper, P. R., Lawson, M., Triffitt, J. T., & Barralet, J. E. (2003). Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials*, 24(20), 3475-3481.

Westhrin, M., Xie, M., Olderøy, M. Ø., Sikorski, P., Strand, B. L., & Standal, T. (2015). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in mineralized alginate matrices. *PLoS One*, 10(3), e0120374.

Whistler, R. L. (1965). Methods in carbohydrate chemistry. Volume 5. *Methods in carbohydrate chemistry*. Volume 5.

Wissing, T. B., Bonito, V., Van Haften, E. E., Van Doeselaar, M., Brugmans, M. M., Janssen, H. M., ... & Smits, A. I. (2019). Macrophage-driven biomaterial degradation depends on scaffold microarchitecture. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 87.

X

Y

Yin, Y., Ji, X., Dong, H., Ying, Y., & Zheng, H. (2008). Study of the swelling dynamics with overshooting effect of hydrogels based on sodium alginate-g-acrylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 682-689.

Yu, T., & Ober, C. K. (2003). Methods for the topographical patterning and patterned surface modification of hydrogels based on hydroxyethyl methacrylate. *Biomacromolecules*, 4(5), 1126-1131.

Z

Zhang, L., Hu, J., & Athanasiou, K. A. (2009). The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 37(1-2).

Zheng, M. H., Willers, C., Kirilak, L., Yates, P., Xu, J., Wood, D., & Shimmin, A. (2007). Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI®): biological and histological assessment. *Tissue engineering*, 13(4), 737-746.

Zhou, G., Garofalo, S., Mukhopadhyay, K., Lefebvre, V., Smith, C. N., Eberspaecher, H., & de Crombrughe, B. (1995). A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1 (II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *Journal of cell science*, 108(12), 3677-3684.

Zhou, Q., Kang, H., Bielec, M., Wu, X., Cheng, Q., Wei, W., & Dai, H. (2018). Influence of different divalent ions cross-linking sodium alginate-polyacrylamide hydrogels on antibacterial properties and wound healing. *Carbohydrate polymers*, 197, 292-304.

Zhou, Z., Yang, D., Nie, J., Ren, Y., & Cui, F. (2009). Injectable poly (ethylene glycol) dimethacrylate-based hydrogels with hydroxyapatite. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24(5), 405-423.

Zhu, L. L., Zaidi, S., Peng, Y., Zhou, H., Moonga, B. S., Blesius, A., ... & Sun, L. (2007). Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. *Biochemical and biophysical research communications*, 355(2), 307-311.

Zimmermann, U., Klöck, G., Federlin, K., Hannig, K., Kowalski, M., Bretzel, R. G., ... & Zekorn, T. (1992). Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis*, 13(1), 269-274.

INDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS

ESQUEMAS

Esquema III.1 Protocolo de extracción de alginato de nervadura (AN) y lámina (AL) del alga <i>Undaria pinnatifida</i> .	53
Esquema III.2 Protocolo de purificación de alginato	55
Esquema IV.1. Modelo “caja de huevo” de entrecruzamiento de alginatos con iones Sr^{+2}	87
Esquema V.1 Determinación del ángulo de contacto	119
Esquema V.2 Representación de hidrogeles SIPN	129

FIGURAS

Figura III.1. Espectro FTIR de las muestras de alginato de sodio: (a) AC, (b) ACP, (c) AN, (d) ANP, (e) AL y (f) ALP	66
Figura III.2. Espectros de 1H-RMN de A) AC-ACP, B) AN-ANP y C) AL-ALP	67
Figura III.3. Estabilidad térmica de AC (A), AN (B), AL (C), ACP (D), ANP (E) y ALP (F)	70
Figura III.4. Extrapolaciones de viscosidad η_{sp}/C o $\ln \eta_{red}/C$ vs C (g/mL)/104 de AC, AN, AL, ACP, ANP Y ALP	72
Figura III.5. Determinación de polifenoles en AN, ANP, AL y ALP.	75
Figura III.6. Determinación semicuantitativa de proteínas en AC, ACP, AN, ANP, AL y ALP por electroforesis en tiras de acetato de celulosa	76
Figura III.7. Viabilidad celular en A) RAW 264.7 y B) CPMO luego de 48 h de incubación con las muestras de alginato de sodio purificadas (ACP, ANP y ALP) e impurificadas (AC, AN y AL)	78
Figura III.8. Biocompatibilidad de alginatos para CPMO luego de 14 días de cultivo en medio de diferenciación osteoblástica en presencia de las muestras de alginato para determinar A) actividad de fosfatasa alcalina (FAL) y B) producción de colágeno tipo 1 (Colt1)	80
Figura III.9. Producción de NO luego de 48 h de incubación con alginatos de sodio. **: $p < 0.01$ vs. control (C); ***: $p < 0.001$ vs. C; #: $p < 0.05$ vs. alginato purificado, ##: $p < 0.01$ vs. alginato purificado	82
Figura III.10. Morfología celular de RAW 264.7. A) Control, B) LPS como control positivo de citotoxicidad, C) ACP, D) AC, E) ANP, F) AN, G) ALP y H) AL	83
Figura IV.1. Liberación de Sr+2 a 1, 2, 3 y 6 días en hidrogeles con A) 1h de gelación B) 12 h de gelación C) 24 h de gelación	98
Figura IV.2. Liberación de Sr+2 luego de 6 días de cultivo para hidrogeles de 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mM formados luego de 1, 12 y 24 h de gelación	97
Figura IV.3. Hinchamiento de hidrogeles a 1, 12 y 24 h	103
Figura V.1. Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles en A) PBS y B) agua durante 720 h	134
Figura V.2. Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles en PBS durante 7 h (420 minutos)	137

Figura V.3. % Pérdida de masa de los hidrogeles luego de degradación en agua y PBS por 30 días, y por macrófagos RAW 264.7 luego de 15 días	138
Figura V.4. Adhesión y proliferación celular de condrocitos luego de 2 y 48 h, respectivamente, sobre los hidrogeles	143
Figura V.5. Adhesión y proliferación celular de macrófagos RAW 264.7 luego de 2 y 48, respectivamente, sobre los hidrogeles.	144
Figura V.6. Adhesión y proliferación celular de CPMO luego de 2 y 48, respectivamente, sobre los hidrogeles.	145
Figura V.7. Actividad de fosfatasa alcalina luego de 15 días de cultivo	146
Figura V.8. Expresión de marcadores osteogénicos en CPMO luego de 15 días de cultivo: A) Fosfatasa alcalina (FAL) B) Runx-2 C) Colágeno tipo 1 (Colt1)	148
Figura V.9. Expresión de marcadores condrogénicos en condrocitos cultivados sobre los hidrogeles luego de 10 días: A) agregán B) SOX9 C) Colágeno tipo 2 (Colt2)	150
Figura V.10. Expresión del marcador no condrogénico, Colt1, en condrocitos cultivados sobre los hidrogeles luego de 10 días	151
Figura V.11. Producción de NO de células RAW 264.7 cultivadas sobre los hidrogeles y el control positivo de citotoxicidad (LPS)	153
Figura V.12. Reosificación (liso) y relleno de tejido conjuntivo (entramado) del defecto óseo.	155

IMAGENES

Imagen I.1. Organización microscópica de fibras de colágeno	9
Imagen I.2. Células del tejido óseo	12
Imagen I.3. Estructura del tejido óseo. A) Anatomía macroscópica del húmero B) Vista esquemática sobre la organización histológica del hueso compacto y esponjoso	15
Imagen I.4. Estructura del hueso trabecular o esponjoso	15
Imagen I.5. Remodelado de superficie ósea	18
Imagen I.6. Consolidación de una fractura	19
Imagen I.7. Estructura molecular de la matriz extracelular (MEC) del cartílago hialino	25
Imagen I.8. Estructura del cartílago articular	26
Imagen I.9. Representación de Microfractura	30
Imagen I.10. Representación de ACI y MACI	32
Imagen I.11. Representación de auto/aloinjerto de un único taco osteocondral	33
Imagen I.12. Representación de Mosaicoplastia	33
Imagen I.13. Representación de un implante en Ingeniería de tejido cartilaginoso	35
Imagen I.14. Esquema representativo de tipos de entrecruzamiento	41
Imagen I.15. Representación de la formación de redes poliméricas interpenetradas (IPN)	42
Imagen III.1. Estructura química de los bloques de alginato	48
Imagen III.2. Partes características correspondientes a un alga de <i>Undaria pinnatifida</i>	52
Imagen III.3. Harina de <i>Undaria pinnatifida</i> de A) Nervadura y B) Lámina	64
Imagen III.4. A) Fibras de alginato de sodio en alcohol. B) Fibras de alginato de sodio filtradas	65

Imagen IV.1. Hidrogeles en estado seco luego de 24 h de gelación	96
Imagen V.1. Estructura de A) Hidroxietil metacrilato (HEMA) y B) Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA)	111
Imagen V.2. Modelo de defecto óseo en calota	114
Imagen V.3. A) Moldes de reacción. B) Vista transversal del molde. C) Sitio de inyección de la mezcla de reacción	116
Imagen V.4. Craneotomía A) antes y B) después de colocar el hidrogel	125
Imagen V.5. Micrografía del corte del defecto sin rellenar. A) Amarillo: área total del defecto. B) Celeste: área de reosificación. C) Negro: área de relleno de tejido conjuntivo	128
Imagen V.6. Imágenes de las membranas obtenidas luego del proceso de purificación. A) pHEMA y B) HA, también representativa de HA-E0.5, HA-E0.25 y HA-A0.5	130
Imagen V.7. Imágenes de SEM de los hidrogeles con una magnificación de 1000. Las barras de escalas corresponden a 10 μm	131
Imagen V.8. Imagen de gota de agua sobre los hidrogeles	140
Imagen V.9. Membranas hidratadas en PBS. A) pHEMA y B) HA, representativa también de HA-E0.25	154
Imagen V.10. Micrografías 4X del corte del defecto A) control; B) HA-E0.25 a modo representativo de los cortes realizados en pHEMA y HA	156
Imagen V.11. Micrografías 4X del corte del defecto teñido con Picosirus red, con y sin luz polarizada	159
Imagen V.12. Micrografías 10X del corte del defecto A) HA y B) HA-E0.5	160
Imagen V.13. Micrografías 40X del corte del defecto A) HA y B) HA-E0.5	162
Imagen V.14. Micrografía del corte del defecto de HA a A) 10X y B) 40X	163
Imagen V.15. Micrografías del corte del defecto de HA teñidas con Picosirus red en A) campo claro y B) luz polarizada	164
Imagen V.16. Micrografía del corte del defecto de pHEMA a A) 10X y B) 40X	166

TABLAS

Tabla I.1. Composición del cartílago articular	23
Tabla III.1. Rendimiento de la extracción y purificación del alginato de sodio (AlgNa) proveniente de <i>Undaria pinnatifida</i>	65
Tabla III.2 Asignación de señales del espectro 1H-RMN (D2O) del alginato	67
Tabla III.3. Fracción molar de los monómeros (G y M) y composición M/G del alginato	69
Tabla III.4. Datos de TGA de AC, ACP, AN, ANP, AL y ALP	70
Tabla III.5. Peso molecular promedio viscosimétrico de las muestras de alginato en NaCl 0.1 M	73
Tabla IV.1. Valores del exponente n en el modelo de Ritger-Peppas según el mecanismo de transporte involucrado para la geometría plana y cilíndrica	94
Tabla IV.2. Exponente difusional n para hidrogeles preparados con diferentes concentraciones de Sr^{+2} , luego de 1, 12 y 24 h de gelación	101
Tabla IV.3. Porcentaje de hinchamiento para hidrogeles luego de 24 h	104
Tabla IV.4. Porcentaje de degradación para hidrogeles de 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mM formados luego de 1, 12 y 24 h de gelación	104
Tabla V.1. Composición de hidrogeles sIPN. *Concentraciones con respecto al volumen de la solución de HEMA + ACP 1%	116
Tabla V.2. Primers marcadores osteogénicos	123
Tabla V.3. Primers marcadores condrogénicos	124
Tabla V.4. Porcentaje de porosidad y tamaño de poro para los diferentes hidrogeles	132
Tabla V.5. Porcentaje de hinchamiento a 720 h (30 días) y exponente n de los hidrogeles en PBS y agua	136
Tabla V.6. Ángulo de contacto de los hidrogeles	141
Tabla V.7. Módulo de Young (E) de los diferentes hidrogeles	142

ABREVIATURAS

AC	alginato comercial
ACI	<i>autologous chondrocyte implatation</i>
ACP	alginato comercial purificado
AIBN	azobisisobutironitrolo
AL	alginato de lámina
ALP	alginato de lámina purificado
AN	alginato de nervadura
ANP	alginato de nervadura purificado
BMP	proteína morfogénica ósea
C	control
cFMS	receptor de factor estimulante de colonias monocito-macrofágicas
COX-2	enzima ciclo-oxigenasa 2
CPMO	células progenitoras de médula ósea
Dlx5	<i>distal-less homeobox 5</i>
DMEM	medio esencial modificado por Dulbecco
EGDMA	etilenglicol dimetacrilato
FAL	fosfatasa alcalina
GAG	glucosaminoglicanos
HA	red polimérica de HEMA entrecruzada con 1% de EGDMA, con 1% de AIBN y semi-interpenetrada con alginato de sodio.
HA-A0.5	red polimérica de HEMA, entrecruzada con 1% EGDMA, con 0.5% de AIBN y semi-interpenetrada con alginato de sodio.
HA-E0.25	red polimérica de HEMA entrecruzada con 0.25% de EGDMA, con 1% de AIBN y semi-interpenetrada con alginato de sodio.
HA-E0.5	red polimérica de HEMA entrecruzada con 0.5% de EGDMA, con 1% de AIBN y semi-interpenetrada con alginato de sodio.
HEMA	monómero 2-hidroxietil metacrilato
IGF	factor de crecimiento similar a la insulina
IL	interleuquina
IPN	red polimérica interpenetrada
MACI	<i>matrix-induced autologous chondrocyte implatation</i>
M-CSF	factor estimulante de colonias monocito-macrofágicas
MEC	matriz extracelular

MSCs	células madre mesenquimales
OCN	osteocalcina
Osx	osterix
PBS	buffer fosfato salino
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
pHEMA	red polimérica de HEMA entrecruzada con EGDMA
RANK	receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
RaSr	anelato de estroncio
Runx-2	<i>Runt related transcription factor 2</i>
SFB	Suero fetal bovino
sIPN	red polimérica semi-interpenetrada
TGF-β	factor de crecimiento transformante β
TNF-α	factor de necrosis tumoral α



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**