



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

MEMORIA DE TITULO

“EFECTO DE LA LIBERACIÓN CONTROLADA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO (PDGF-BB) SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS SOBRE UN COMPÓSITO DE QUITOSANO-HIDROXIAPATITA”

Alumna:

Paulina Francisca Urbina Guerra

Las Cadenas s/n, Comuna Sta. María, Ciudad San
Felipe, Región Valparaíso.

Teléfono celular: 87362143

Profesora Guía:

María Soledad Fernández Garay

Departamento de Ciencias Biológicas Animales
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile

Financiamiento:

FONDECYT 1080185

FONDAP 11980002

**SANTIAGO – CHILE
2011**

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. Consideraciones generales.....	5
Células óseas	6
Matriz ósea	8
Regeneración ósea	10
Fases del remodelado.....	11
Factores reguladores del remodelado óseo	12
Factores de crecimiento relacionados con la remodelación	12
2. Biomateriales e Implantes	14
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Adición del factor de crecimiento al compósito.....	25
1. Cultivo de osteoblastos.....	25
2. Evaluación de la liberación del PDGF-BB para el Grupo B y Grupo C	25
3. Proliferación de células osteoblásticas	26
4. Morfología de los osteoblastos	26
5. Diferenciación de osteoblastos	27
5.1. Medición de actividad de fosfatasa alcalina	27
5.2. Análisis de mineralización del compósito	28
5.3 Examen histológico de los compósitos porosos multilaminares de quitosano cultivados in vitro	28
Análisis Estadístico	28
RESULTADOS	29
1. Evaluación de la liberación del PDGF-BB para el Grupo B y Grupo C	29
1.1. Curva estándar de factor de crecimiento PDGF-BB	29
1.2. Medición del factor de crecimiento PDGF-BB liberado desde el compósito al medio de cultivo.....	30
2. Proliferación de células osteoblásticas	32
2.1. Curva estándar de proliferación de osteoblastos usando método MTT..	32
2.2. Proliferación de osteoblastos dentro de los compósitos del grupo A y grupo B.	33
3. Diferenciación celular.....	34
3.1. Actividad de fosfatasa alcalina	34
3.2. Análisis cuantitativo de calcio.....	38
3.4. Análisis histológico	39
4. Morfología Celular	42
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIÓN	49
BIBLIOGRAFÍA	50

INTRODUCCIÓN

Recientemente, las investigaciones sobre biomateriales están orientadas a mejorar el desarrollo de los compósitos o materiales sintetizados a partir de dos polímeros, para su uso en la medicina regenerativa. El rápido desarrollo del campo de la ingeniería de tejidos (IT) apunta a reemplazar o facilitar la regeneración del tejido dañado, a través de la aplicación de materiales combinados, células y moléculas bioactivas (Chen y Mooney, 2003). Una alternativa para la restauración del hueso es la utilización de trasplantes óseos convencionales, sin embargo, estas opciones implican problemas tales como, una escasa cantidad de tejido, una potencial transferencia de patógenos, dificultad de moldear el hueso e inducción de una respuesta inmune alrededor del implante (Ge *et al.*, 2004).

La IT intenta crear sustitutos de tejido, a través de matrices de polímeros sintéticos tridimensionales, dentro de los cuales las células son cultivadas. Estas matrices de polímeros, con estructura porosa, han demostrado mejorar la regeneración ósea a través de la creación y mantenimiento de canales que facilitan la migración, proliferación y diferenciación de las células progenitoras (Ge *et al.*, 2004). Estas células trasplantadas secretan matriz extracelular y factores necesarios para el crecimiento del tejido óseo, mientras que la matriz polimérica se va degradando gradualmente (Seol *et al.*, 2004).

La estructura porosa tridimensional de estos polímeros permite maximizar la difusión de los productos celulares y el desarrollo vascular dentro de la estructura implantada. El polímero es completamente reabsorbido en un tiempo determinado, permitiendo la nueva formación de tejido. Los primeros compósitos biodegradables, que cumplen los criterios necesarios de biocompatibilidad y degradación controlada, son el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros (PLGAs) (Ge *et al.*, 2004). Sin embargo, tienen desventajas como una alta inmunogenicidad y una débil resistencia mecánica (Seol *et al.*, 2004). Esto lleva a considerar otro tipo de polímeros naturales como el colágeno, el ácido hialurónico y el quitosano (CHI). El CHI, cuyo precursor es la quitina, uno de los polímeros naturales más abundantes, ha demostrado mejorar la función del sistema inmune en animales, acelerar la cicatrización y es usado como material biocompatible y absorbible.

El mayor constituyente inorgánico del tejido óseo es la hidroxiapatita (HA), que tiene buenas propiedades mecánicas y biocompatibilidad cuando es utilizada como material para implantes en dientes y hueso (Ge *et al.*, 2004).

No basta solo con un compósito para una regeneración ósea adecuada, la presencia de factores de crecimiento puede estimular a las células residentes como también a las células transplantadas (Chen y Mooney, 2003). Entre los factores de crecimiento, se encuentra el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que es un potente mitogénico y quimiotáctico para las células de origen mesenquimático, incluyendo células periodontales y osteoblastos (Lee *et al.*, 2000a). Los factores de crecimiento pueden ser liberados localmente a través del uso de diferentes vehículos poliméricos que promueven un método controlado de liberación en un tiempo adecuado (Chen y Mooney, 2003).

Fernandez *et al.*, (2011) probaron un compósito multilaminar poroso de quitosano-hidroxiapatita, con buenos resultados en proliferación y diferenciación osteoblástica.

Por lo tanto, es razonable proponer el uso de un compósito compuesto por CHI e HA en una disposición multilaminar similar al tejido óseo, usando el factor de crecimiento PDGF para aumentar la proliferación y diferenciación celular.

Es por esta razón que en esta Memoria de Título se identificó el efecto de los factores de crecimiento sobre las células osteoblásticas cultivadas en compósitos multilaminares compuestos de CHI e HA, proyecto que se encuentra enmarcado dentro de las actividades del Proyecto FONDECYT 1080185 y del programa de materiales biocerámicos del Centro de Investigación Interdisciplinario Avanzado en Ciencias de los Materiales (CIMAT) de la Universidad de Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Consideraciones generales

El hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse, permitiendo la *restitutio ad integrum* tras el trauma. Cuando se produce una fractura, se coloca un implante osteointegrado o se realiza un injerto para aumentar el sustrato óseo antes de la inserción de implantes, lo que se pretende es la regeneración ósea, es decir, la formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, sea idéntico al preexistente. (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a). A través de la remodelación celular, la estructura dañada por fatiga es repuesta gracias a la reparación ósea y se adapta continuamente a los cambios en el uso mecánico. Cuando un hueso sufre un trauma, como daño físico o cirugía, se requiere un soporte mecánico temporal para reestablecer la funcionalidad del hueso, mientras se produce la curación natural (Bandyopadhyay-Ghosh, 2008).

Según Jensen *et al.* (2007) el hueso es un tejido calcificado, que muestra una compleja estructura, incluidas las células, las fibras de colágeno, y una matriz extracelular calcificada. El hueso tiene notables propiedades mecánicas que permiten el apoyo del cuerpo entero, mostrando rigidez con muy alta resistencia a la compresión, pero al mismo tiempo, una mayor flexibilidad. El hueso es uno de los tejidos más dinámicos en el cuerpo, con la curación muy rápida en respuesta a las lesiones. Las fibras de colágeno de la matriz abarca cerca de 25 -30% de la masa del tejido óseo y tiene una papel importante en no permitir que el hueso se rompa. El componente de mineralización (alrededor del 65% de la masa ósea) se debe principalmente a la formación por fosfato de calcio, hidroxapatita, y le da al hueso dureza y rigidez.

El hueso es un tejido rígido que constituye la mayor parte del esqueleto de los vertebrados superiores. Está formado por células y una matriz intercelular. Su principal componente orgánico, las fibras colágenas, forma un armazón de refuerzo. Las sales inorgánicas encargadas de dar dureza y rigidez al hueso incluyen fosfato de calcio (alrededor de 85%), carbonato de calcio (10%) y pequeñas cantidades de fluoruro de calcio y fluoruro de magnesio. Las fibras colágenas contribuyen en gran parte a la fuerza y resistencia del hueso. El mineral óseo, cuyo principal componente es la hidroxapatita está dentro de las fibrillas colágenas como cristales de apatita. Si se

examina microscópicamente un corte longitudinal de un hueso largo, de inmediato se distinguen dos tipos de tejido óseo: una capa externa dura de revestimiento de hueso *compacto* (denso), y un tipo abierto de tejido, hueso *esponjoso* (trabecular), que consta de trabéculas o barras delgadas de hueso que se anastomosan para formar una especie de celosía de tejido óseo en el interior del hueso compacto. Ambos contienen los mismos elementos histológicos. Las proporciones relativas entre estos dos tipos de hueso varían con las necesidades de resistencia o ligereza en el peso (Leeson *et al*, 1990)

Células óseas

En el hueso coexisten varios tipos de células que se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimáticas pluripotenciales indiferenciadas (o mesenchymal stem cells). Estas stem cells pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a).

- El osteoblasto.

Estas células se relacionan con la formación de hueso y se encuentran de manera invariable en la periferia de los huesos en crecimiento, donde se está depositando la matriz ósea (Leeson *et al*, 1990). Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a).

El gran núcleo, que suele localizarse en la región basal, muestra un nucléolo muy notable. El citoplasma es basófilo en extremo debido a la presencia de nucleoproteína de ribosa, que se relaciona probablemente con la síntesis de componentes orgánicos de la matriz ósea (esto es, colágeno y glicoproteínas). Las mitocondrias son abundantes y por lo general alargadas. El papel de los osteoblastos en la secreción de colágeno óseo ha sido bien comprobado. Esta matriz recién sintetizada y aún no calcificada cercana a los osteoblastos se llama *osteoides*. Los osteoblastos contienen la enzima fosfatasa alcalina (FA), lo cual sugiere que están en relación con la elaboración de matriz y también con su calcificación. Se cree que esta enzima degrada los inhibidores locales de la calcificación en la matriz y que libera iones fosfato de los sustratos (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a). Los osteoblastos son células polarizadas en que la expulsión de materiales sintetizados tiene lugar en la superficie celular en los puntos de contacto

con la matriz ósea. Cuando dejan de producir sus productos particulares se aplanan y, al mismo tiempo, disminuye la basofilia citoplasmática, así como la cantidad de fosfatasa alcalina.

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan FA, que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a). Actualmente, se sabe que los osteoblastos:

1. sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso
2. dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular
3. contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina
4. median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas
5. sintetizan factores de crecimiento

- El osteocito.

Al quedar aprisionada en la matriz dura, la célula osteogénica original, ahora llamada *osteocito*, no tiene oportunidad de dividirse o de secretar matriz en cantidades apreciables. El osteocito, a semejanza del condrocito, ocupa una pequeña cavidad o laguna en la matriz, pero a diferencia del mismo no está aislado de los demás. Los osteocitos no se dividen, según lo prueba el hecho de que siempre se encuentra una sola célula en cada laguna. Tienen citoplasma con ligera basofilia en el que se puede demostrar que contiene gotitas de grasa, algo de glucógeno y gránulos finos semejantes a los que se hallan en los osteoblastos. El núcleo muestra cromatina nuclear condensada y se tiñe de color rojo oscuro. Hay una reducción importante del retículo endoplasmático rugoso y del complejo de Golgi. Los osteocitos jóvenes se encuentran más cerca de las superficies óseas y en lagunas redondas. Los osteocitos maduros están en lagunas ovals o lenticulares. Las prolongaciones celulares de los osteocitos se extienden por distancias considerables en los conductillos, que irradian a partir de las lagunas (Leeson *et al*, 1990).

Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos

se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una estructura única, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, lo que asegura el oxígeno y los nutrientes. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción. Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a).

- El osteoclasto.

Las células encargadas de la reabsorción son los osteoclastos. Se trata de células grandes (100 μm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto *in vivo* como *in vitro* (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a). Los osteoclastos secretan colagenasa y otras enzimas proteolíticas que atacan la matriz ósea y liberan la matriz orgánica calcificada. Cuando se completa el proceso de resorción, los osteoclastos desaparecen, probablemente por degeneración o regresión a su tipo de célula de origen (Leeson *et al*, 1990).

Matriz ósea

Aunque en apariencia la sustancia intercelular del hueso es homogénea, tiene una estructura bien ordenada. Sus dos componentes principales son la matriz orgánica y las sales inorgánicas (Leeson *et al*, 1990).

La **matriz orgánica** o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%). Actualmente la matriz mineralizada extracelular se considera como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a)

- El colágeno:

El 90% de la matriz extracelular (MEC) está constituida por colágeno, sobre todo tipo I (95%) y tipo V (5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III y tipo XII, formado bajo estrés mecánico. Además, contiene los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

- Proteínas no colágenas: Entre ellas destacan:

- Proteoglicanos: Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. En la matriz osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos: Hialuronano y Condroitín-sulfato: intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea. Biglicano y decorina: aparecen en las fases siguientes de la formación ósea.
- Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico: Son la osteocalcina (OCN) y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido γ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos.
- Glicoproteínas: Son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp). La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal. La FA es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la

mineralización. Existen varias isoenzimas y, entre ellas la ósea, se ha considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica. Proteínas con el tripéptido RGD, también llamadas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos. También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales.

- Proteínas procedentes del plasma: Se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la α_2 -SH-glicoproteína, probablemente relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.
- **Factores de Crecimiento:** Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a).

El **componente mineral** del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de **hidroxiapatita (HA)** $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a).

Regeneración ósea

Según Fernández-Tresguerres *et al*, (2006a), la regeneración tisular es la respuesta que consigue la *restitutio ad integrum* del tejido tras un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original. En este sentido el hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión. La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos

sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Tras un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial, con eritrocitos, plaquetas y fibrina. Las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimáticas pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial. Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. En este proceso es fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización.

Fases del remodelado

Según Fernández-Tresguerres *et al* (2006b), las fases del remodelado óseo son las siguientes:

Fase quiescente: Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos.

Fase de reabsorción: Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), **PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas)**, IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).

Fase de formación: Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular

Factores reguladores del remodelado óseo

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción. Este fenómeno equilibrado, denominado proceso de remodelado, permite la renovación de un 5-15 % del hueso total al año en condiciones normales. El remodelado óseo consiste en la reabsorción de una cantidad determinada de hueso llevada a cabo por los osteoclastos, así como la formación de la matriz osteoide por los osteoblastos y su posterior mineralización. Este fenómeno tiene lugar en pequeñas áreas de la zona cortical o de la superficie trabecular, llamadas “unidades básicas de remodelado óseo”. El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales. Con respecto a los factores locales; el remodelado óseo también está regulado por factores locales, entre los que destacan los factores de crecimiento, las citoquinas y recientemente se han implicado las proteínas de la matriz ósea, como moduladoras de la acción de otros factores locales. Las células del hueso también juegan un papel importante por la producción de prostaglandinas y óxido nítrico, así como de citoquinas y factores de crecimiento (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

Factores de crecimiento relacionados con la remodelación

Los llamados Factores de Crecimiento son proteínas que estimulan el crecimiento y división celular. Se conocen varios factores de crecimiento que regulan los procesos de desarrollo, entre los cuales se encuentran el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), el Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo I (IGF-I) y el Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF). (Morales-Álvarez y Ariza, 2005). Para Fernández-Tresguerres *et al.*, (2006b) los factores de crecimiento son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos, que actúan como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular, dentro de los más importantes se encuentra:

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor): El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) fue identificado por primera vez en una búsqueda de factores en el suero que estimulan la proliferación de células del músculo liso arterial. Desde entonces, los PDGFs mamíferos han sido ampliamente caracterizados en ensayos basados en el cultivo, donde se ha demostrado su rol en la conducción de respuestas celulares, incluyendo la proliferación, supervivencia, migración, y el depósito de matriz extracelular (MEC) y factores en la remodelación de tejido (Hoch, y Soriano, 2003).

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas juega un papel crítico en la proliferación y desarrollo celular. Fue aislado por primera vez a partir de plaquetas durante la degranulación, y se sabe hoy en día que también es producto de un amplio rango de tipos celulares dentro de los cuales se incluyen fibroblastos, músculo, hueso/cartílago, y células del tejido conectivo (Morales-Álvarez y Ariza, 2005). PDGF por un lado estimula la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos y por otro, favorece la reabsorción ósea. Otros efectos son la proliferación de fibroblastos, así como de células musculares lisas, la neovascularización y la síntesis de colágeno, por lo que favorece la cicatrización (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b). Según Morales-Álvarez y Ariza (2005), la forma biológicamente activa de PDGF es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro. Puede estar presente como homodímero o como heterodímero y dependiendo del tipo de dímero formado muestra actividad diferencial. PDGF es el producto de cuatro diferentes genes que son ensamblados en cinco isoformas distintas conocidas como: AA, AB, BB, CC y DD, siendo las cadenas C y D las más recientemente identificadas.

Según Betsholtz, (2003), estudios han demostrado que las distintas poblaciones de células progenitoras mesenquimales y neuroectodérmicas dependerán de la señalización de PDGF para su crecimiento y distribución dentro del desarrollo de órganos.

El PDGF, miembro de las BMPs, es considerado una de las principales citoquinas que participan en la reparación de tejidos (Lee *et al.*, 2000a). PDGF es un agente mitógeno y quimiotáctico de fibroblastos y células musculares que estimula a macrófagos a secretar otros factores importantes en varias etapas de la reparación. PDGF también estimula la producción de varias moléculas de matriz extracelular (ECM), incluyendo colágeno I y fibronectina (Chen y Mooney, 2003).

Además de conducir la proliferación de células mesenquimales, los PDGFs han demostrado dirigir la migración, diferenciación y función de una variedad de células

mesenquimales especializadas y la migración de este tipo de células, tanto durante el desarrollo como en la vida de un animal adulto (Hoch, y Soriano, 2003).

El factor de crecimiento PDGF-BB, es liberado desde las plaquetas en forma activa y tiene una vida media \square 2 minutos, sin embargo en ensayos *in vitro* el pico de concentración fue a las 72-120 horas (McCarrel y Fortie, 2009).

2. Biomateriales e Implantes

El hueso autógeno es considerado como el estándar de oro para materiales de injerto óseo, ya que proporciona los tres elementos necesarios para generar y mantener los huesos: soporte estructural para la osteoconducción, factores de crecimiento para osteoinducción, y las células progenitoras para la osteogénesis (Agarwala y Bhagwat, 2005).

Los Biomateriales utilizados como implantes, pueden ser de origen artificial o natural, son usados para reemplazar la estructura biológica perdida o enferma recuperando su forma y función. Por lo tanto el biomaterial ayuda a mejorar la calidad de vida y la longevidad de los seres humanos. El campo de biomateriales ha demostrado un crecimiento rápido para mantener las exigencias de una población que envejece. Los biomateriales se utilizan en diferentes partes del cuerpo humano tales como válvulas artificiales en el corazón, los stents en vasos sanguíneos, los implantes de reemplazo en hombros, rodillas, caderas, codos, las orejas y las estructuras orodental (Geetha *et al.*, 2009).

Cuando un hueso sufre un trauma, tales como daño físico o cirugía, un soporte mecánico temporal puede permitir que el hueso reponga su funcionalidad, mientras se produce la regeneración natural. Con respecto al injerto óseo, los biomateriales bioactivos están ganando popularidad para reemplazar al hueso. Estos biomateriales forman una fuerte unión interfacial con los tejidos vivos, los huesos y los tejidos blandos conectivos y la elasticidad es muy similar al hueso. Los implantes bioactivos así proporcionan un mejor medio de ayuda al cuerpo en su proceso de reparación (Bandyopadhyay-Ghosh, 2008).

Para Wang, (2006) los implantes tradicionales a base de polímeros biodegradables como el poli-ácido láctico y poli ácido láctico-ácido glicólico son débiles y no osteoconductivos.

Los materiales utilizados para implantes ortopédicos especialmente para aplicaciones de carga deben poseer excelente **biocompatibilidad**, superar la resistencia a la corrosión en el entorno del cuerpo, excelente combinación de alta resistencia y bajo módulo y de alta resistencia a la fatiga y al desgaste, alta ductilidad y sin citotoxicidad. En la actualidad, los materiales utilizados para estas aplicaciones son de acero inoxidable 316L, aleaciones de cromo y cobalto y aleaciones de titanio. Desafortunadamente, estos materiales han mostrado tendencias a fallar después de su uso a largo plazo, debido a diversas razones tales como alto desgaste y baja resistencia a la corrosión del implante y falta de biocompatibilidad (Geetha *et al.*, 2009).

Estos biomateriales se pueden subdividir en tres clases generales: **biotolerantes**, **bioactivos**, y **bioabsorbibles**, basándose en su nivel de interacción con el tejido circundante y el tipo de respuesta celular provocada. Generalmente una de las características de los materiales **biotolerantes** es la formación de cápsulas de tejido conectivo fino alrededor de los dispositivos implantados. En cambio las superficies de los materiales **bioactivos** están diseñadas para interactuar con el entorno del tejido de tal manera que inducen la formación de hueso en contacto directo con el implante. Idealmente, estos materiales se colocan en la unión de los huesos para formar una unión sin fisuras entre el biomaterial y la matriz extracelular de las células óseas adyacentes. En la mayoría de los casos, sin embargo, sólo una aposición apretada o interdigitación se produce en este cruce. La incorporación exitosa (y por lo tanto, la fijación rígida) de un material aloplástico dentro de su entorno óseo generalmente se conoce como **osteointegración**. Los materiales bioactivos pueden ser procedentes de tejidos naturales, como hidroxapatita, o pueden ser completamente creados por el hombre, como biovidrios y fosfatos de calcio sintéticos, incluyendo hidroxapatita. Tanto los metales como el titanio puro comercial pueden ser materiales bioactivos, pero siguen siendo un tema de debate. Los materiales **biodegradables** están diseñados para ser en última instancia reemplazadas por tejido autólogo. Muchos de estos materiales están compuestos de agentes biológicos tales como células, extractos de tejidos o proteínas y un soporte estructural del sistema e injerto óseo procesados. Lo ideal sería que, después el material se reabsorba, sin dejar ninguna traza del implante. Estos materiales, por lo tanto, se limitan generalmente a componentes que puedan ser rápidamente metabolizados por el cuerpo, como productos derivados del colágeno, el ácido poliláctico y polímeros de ácido poliglicólico, (Kieswetter *et al.*, 1996).

Un implante idóneo, debe ser lo más similar en la arquitectura de un hueso real, el cual consta de un hueso compacto, en el cual las laminillas se disponen de manera regular en una forma regida por la distribución de los vasos sanguíneos que nutren al hueso. Las laminillas se disponen en forma concéntrica alrededor de los conductos vasculares (*conductos de Havers*) para formar unidades estructurales cilíndricas llamadas *sistemas de Havers* u *osteonas*. Las laminillas de matriz ósea, las células y el conducto central de Havers constituyen la osteona, unidad estructural del hueso compacto. Cada osteona consta de 5 a 20 laminillas que rodean al conducto central de Havers en el que se encuentran vasos sanguíneos y nervios. La estructura de las trabéculas o láminas del hueso esponjoso es semejante a las del hueso compacto. Las pequeñas trabéculas carecen de sistemas de laminillas, pues no son penetradas por los vasos sanguíneos, sino que están rodeadas por espacios medulares vasculares. Sus laminillas contienen lagunas con osteocitos y un sistema de conductillos intercomunicantes (Leeson *et al.*, 1990).

La rugosidad de la superficie, la topografía y la composición del implante, pueden desempeñar un papel importante en determinar qué proteínas y células se adhieren en la superficie. Para que una osteointegración o unión de hueso pueda ocurrir, deben darse una serie de eventos que van desde la adsorción de proteínas a la síntesis de osteoide en la superficie del implante. En resumen, estos eventos pueden resumirse en la adsorción de proteína, la adhesión celular, proliferación, diferenciación, producción de la matriz, y la calcificación (Kieswetter *et al.*, 1996).

Los injertos óseos se han utilizado para rellenar los defectos óseos causados por enfermedades o traumatismos, como fracturas óseas, infecciones, y tumores agresivos. Debido a las limitaciones asociadas con aloinjertos y xenoinjertos, los autoinjertos han sido considerados como el patrón clínico ideal para injertos óseos. Sin embargo, los autoinjertos son limitados en la oferta y con frecuencia conducen a la morbilidad de la zona donante. En la última década, el principal objetivo de la ingeniería de tejido óseo ha sido desarrollar materiales artificiales de hueso para sustituir los autoinjertos que se usan para defectos óseos de mayor tamaño. Un implante de hueso artificial ideal debe ser **biocompatible, biodegradable, y osteoconductor**, debe mantener la mecánica de los huesos con fuerza adecuada, dejando espacio para la formación de hueso nuevo. (Aijun *et al.*, 2008)

Para Agarwala y Bhagwat (2005), el sustituto de injerto óseo ideal debe ser barato, fácilmente disponible, fácil de fabricar, lo suficientemente fuerte y debe poseer, propiedades osteoinductivas, osteoconductivos y osteogénicas. Por lo tanto existen tres tipos de sustitutos óseos: suplentes que proporcionan un soporte estructural para la osteoconducción: **agentes osteoconductivos**; suplentes que inducen la diferenciación de células madre: **agentes osteoinductivos**; suplentes que ofrecen las células madre (aspirado de médula ósea): **agentes osteogénicas** y varias combinaciones de los mencionados agentes.

Los compósitos, formados por polímeros naturales, tienen más ventajas que los polímeros sintéticos, en la medida en que facilitan la adhesión de las células y mantienen la diferenciación de éstas. El CHI y el colágeno se encuentran entre los polímeros naturales biodegradables más utilizados para construir este tipo de compósitos (Arpornmaeklong *et al.*, 2007).

El **quitosano** (CHI) es un polímero natural, obtenido a partir de caparazón de crustáceos y de los desechos de la industria de mariscos. Cuenta con propiedades novedosas como biocompatibilidad, biodegradabilidad, capacidad antibacteriana, y mejora la cicatrización de heridas (Kim *et al.*, 2008). El CHI es un polisacárido catiónico con residuos N-acetilglucosamina, con propiedades osteocompatibles y osteoconductivas, además acelera la reparación del hueso. El CHI implantado en vertebrados puede funcionar como sustrato mejorando la diferenciación de células progenitoras de tipos específicos (Seol *et al.*, 2004). El CHI, presenta una perfecta biocompatibilidad y biodegradabilidad, es bien conocido por sus aplicaciones biomédicas (Aijun *et al.*, 2008).

Según Lee *et al.* (2000b), las propiedades que debería tener un compósito adecuado para ser usado como trasplante, son:

1. Las células deben adherirse a la superficie del compósito, ya que ellas necesitan de canales que les permitan desarrollarse dentro de los compósitos.
2. Proveer un ambiente adecuado para la proliferación y función de los osteoblastos.
3. Permitir el desarrollo de tejido vascular para asegurar la sobrevivencia de las células.

4. Ser biodegradable y los productos de la degradación deberían ser fácilmente metabolizados y excretados.
5. Ser fácilmente moldeable para tomar diferentes formas tridimensionales.

El CHI potencia la diferenciación de células osteoprogenitoras y puede facilitar la formación ósea. Además, facilita indirectamente la osteogénesis porque interfiere con la función de células que inhiben la formación ósea como son los fibroblastos. Arpornmaeklong *et al.* (2007) postulan, que la fuerte atracción entre las cargas positivas que se encuentran en la superficie del CHI y las cargas negativas de la superficie celular aumentan la actividad metabólica de las células en el compuesto de CHI. Por otro lado, el CHI, tiene la capacidad para adoptar varias formas desde polvo, gel y solución, convirtiéndose en un buen candidato para aplicaciones clínicas como transportador periodontal y en terapia regenerativa de hueso.

Según Wang, (2006) hoy, la ingeniería de tejido óseo, se basa en implantes compuestos de polímeros que contengan biocerámicas como **hidroxiapatita**. Estas biocerámicas pueden ser incorporadas en los implantes como fase dispersa secundaria o formar una delgada capa que recubre la superficie de los poros de estos implantes poliméricos. Esto hace que la fase biocerámico refuerce la bioactividad de los compósitos.

La **hidroxiapatita** (HA) es el material bioactivo más ampliamente aceptado para la reparación y reconstrucción de defectos óseos debido a su similitud estructural con la parte inorgánica del hueso (Aijun *et al.*, 2008).

Según Lee *et al.* (2000a) el CHI puede formar híbridos con cualquier material inorgánico mejorando el crecimiento del hueso. El quitosano-hidroxiapatita (CHI-HA) y el quitosano-fosfato tricálcico (CHI-TCP) en forma de pasta son usados para el tratamiento de alteraciones periodontales, además la combinación de CHI más HA posee propiedades osteoconductoras y puede, clínicamente, por sí sólo ser un sustituto óseo bioactivo (Lee *et al.*, 2000a). Kim *et al.* (2008) sugieren, que el CHI y sus derivados son prometedores candidatos para ser usados como implantes óseos, dadas sus propiedades de fácil modificación química y alta afinidad a las macromoléculas *in vivo*.

Ge *et al.* (2004) usaron compósitos de CHI con diferentes proporciones de HA, demostrando que los implantes intramusculares de compósitos en ratas son degradados

y no tóxicos para el animal. Además, la presencia de HA mejora la calcificación y acelera la degradación de la matriz de CHI.

Xu y Simon (2005), estudiaron un cemento de fosfato de calcio (CPC) para reparación ósea, los resultados mostraron grandes desventajas como la no disolución del cemento en soluciones fisiológicas, resistencia relativamente baja, susceptibilidad a la fractura y un tamaño de microporos (poros de un diámetro menor a 100µm), siendo este punto muy importante para ser un compuesto adecuado. En otro estudio se demostró que implantes de HA con un tamaño de macroporo alrededor de 100 µm, son necesarios para el crecimiento de los huesos. Los macroporos facilitan la infiltración de células y el crecimiento de tejidos. Sin embargo, nuevos implantes de CPC con macroporos disminuyeron en forma significativa la resistencia mecánica. Arpornmaeklong *et al.* (2007), probaron compósitos de CHI-colágeno, con un tamaño de poros promedio de 80-100 µm. La combinación de CHI y matrices de colágeno crearon compósitos bien definidos y con microestructura porosa biocompatible. Seol *et al.* (2004) construyeron compósitos de CHI porosos con un diámetro de poros de 100-200 µm, cultivaron osteoblastos y midieron la proliferación y diferenciación celular, demostrando que estos compósitos de CHI soportan la proliferación de los osteoblastos sembrados, así como su diferenciación detectada por alta actividad de fosfatasa alcalina y gran cantidad de calcio depositado. En otro estudio de Lee *et al.* (2000b), se probó la aplicabilidad de un compuesto de CHI-fosfato tricálcico, con un diámetro de poros de 100 µm. Dentro del compuesto, los osteoblastos se adhirieron fácilmente a la superficie y proliferaron lo que indica un tamaño de poros adecuado para la migración. Oliveira *et al.* (2006) desarrollaron un compuesto bilaminar HA/CHI, demostrando que sus propiedades fisicoquímicas hacen de ellos un adecuado candidato, para ser usado como una estructura de apoyo para las funciones celulares.

Según Aijun *et al.*, (2008) los últimos trabajos se han centrado en el diseño de compuestos de hidroxiapatita / quitosano (HCC), como implante óseo y siendo probado su porosidad adecuada y buena compatibilidad con los osteoblastos. Sin embargo se teme a no poder responder a la exigencia de la reparación de un defecto óseo de tamaño crítico por la ausencia de citoquinas que median la osteogénesis.

El CHI, al ser un biopolímero natural biodegradable y no tóxico, ha sido usado para diferentes aplicaciones biomédicas demostrando la capacidad de liberar, en forma

regulada, agentes bioactivos incluyendo, factores de crecimiento, antibióticos y drogas anti-inflamatorias (Lee *et al.*, 2000a).

Durante todos los estímulos de formación ósea, las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) especialmente las de la familia de las proteína morfogenéticas óseas 2 (BMP-2) ocupan un lugar importante. Su capacidad osteoinductiva ha sido verificada por numerosos ensayos experimentales y clínicos. En uno de los ensayos se realizó una transfección de genes BMP-2 en compósitos de tejido óseo, por medio de la modificación de proteínas recombinantes o de nanopartículas, obteniendo una exitosa recuperación en los animales tratados. Las BMP-2 tienen una mayor eficacia que los autoinjertos ya que inducen una fusión ósea exitosa (Aijun *et al.*, 2008).

El uso de factores de crecimiento, en particular las BMPs, mejora la reparación de fracturas de huesos largos, siendo una modalidad de tratamiento relativamente novedoso. Las BMPs es una de las familias de factores de crecimiento más estudiadas e importantes asociadas con la reparación ósea (Southwood *et al.*, 2004). Resultados de estudios clínicos y experimentales han estimulado el uso clínico de BMPs para el tratamiento de fracturas graves. Los sistemas poliméricos pueden ser usados eficazmente para administrar pequeñas dosis de factores de crecimiento. Una técnica simple para liberar el factor desde un sistema polimérico consiste en mezclarlo con gel de albúmina. Se han construido varios tipos de estructuras que cumplen este rol, dentro de las cuales se encuentran hidrogeles, microesferas y compósitos porosos tridimensionales. La liberación de moléculas a partir de estos transportadores tiene la particularidad de controlar la difusión del factor y la dosis del factor que se carga en el sistema (Chen y Mooney, 2003).

Según Chen y Money (2003), la utilización de sustratos conductivos que liberan biomoléculas inductivas puede mejorar la regeneración ósea debido al efecto combinado entre el transportador y el factor. Los materiales osteoconductivos incluyen a la HA, fosfato de calcio y una variedad de biocerámicas y, últimamente, se han usado con éxito compósitos poliméricos mineralizados.

Las proteínas requieren de métodos de liberación sofisticados para mantener una concentración proteica adecuada en la reparación por un tiempo adecuado. La inyección de una solución de BMP o factores de crecimiento dentro de una fractura podrían ser reabsorbidas rápidamente, causando una disminución en las concentraciones necesarias

para que el factor de crecimiento pueda actuar efectivamente. La mantención de concentraciones adecuadas con una dosis inicial alta podría ser muy citotóxico. Los factores de crecimiento necesitan de transportadores que los liberen en forma controlada manteniendo las concentraciones necesarias para reparar una fractura en forma eficiente. Varios sistemas de transporte tienen desventajas por su rápida biodegradación, por reacciones inflamatorias, elevada respuesta inmunogénica, transmisión de enfermedades e incapacidad de promover concentraciones altas del factor en forma constante (Southwood *et al*, 2004).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), miembro de las BMPs, es considerado una de las principales citoquinas que participan en la reparación de tejidos (Lee *et al.*, 2000a). PDGF es un agente mitógeno y quimiotáctico de fibroblastos y células musculares que estimula a macrófagos a secretar otros factores importantes en varias etapas de la reparación. PDGF también estimula la producción de varias moléculas de matriz extracelular (ECM), incluyendo colágeno I y fibronectina (Chen y Mooney, 2003).

En un estudio de Lee *et al.* (2002), se comparó la liberación de PDGF-BB (homodímero de cadenas B) a partir de matrices de CHI con diferentes proporciones de condroitin-4-sulfato (CS) y matrices de poli (L-láctido) (PLLA) cubiertas de CHI. Y se demostró que a mayor proporción de CS, la liberación de PDGF-BB es menor en forma mantenida, en cambio, las matrices de PLLA cubiertas de CHI mostraron la liberación más baja. La razón es que existe una interacción iónica entre el CS aniónico y PDGF-BB catiónico, permitiendo una liberación controlada de éste dentro de la matriz de CHI-CS. La liberación inicial de PDGF-BB fue mayor en el compósito CHI-CS que en el compósito CHI-PLLA, esta reducida liberación inicial puede deberse a la retención de PDGF-BB por la superficie hidrofóbica de PLLA. El CHI mejora la humedad de la matriz de PLLA y la estructura porosa sirve como canales para la liberación del PDGF-BB atrapado.

Lee *et al.* (2000a), evaluaron el efecto osteogénico del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) cargándolo en compósitos biodegradables de quitosano/fosfato tricálcico (CHI-TCP); los hallazgos histomorfométricos, *in vitro*, demostraron el efecto osteoconductor del compósito por sí solo y, que la adición del

PDGF-BB mejoraba la regeneración ósea. El compósito fue capaz de liberar constantemente, el PDGF-BB en forma mantenida por 3 semanas. El estudio *in vivo* no mostró reacción adversa y la degradación de la matriz del compósito fue reemplazada por hueso regenerado sin invasión de tejido conectivo. Las ventajas del CHI-TCP incluyen una buena compatibilidad ósea y una degradación en el tiempo adecuado dentro del hueso; las desventajas del CHI-TCP como único material incluyen, una resorción incontrolada y ausencia sustancial de formación de hueso en el defecto óseo. Al ser CHI-TCP muy compatible con el hueso tiene una mayor probabilidad de ser encapsulado por tejido blando.

Un compósito multilaminar de quitosano-hidroxiapatita, de porosidad mayor a 100 μm , con células osteoblásticas cultivadas en su interior y liberando factor de crecimiento PDGF-BB para aumentar la proliferación y diferenciación, sería la triada que busca la ingeniería de tejidos para una regeneración ósea deseada.

HIPÓTESIS

Dado que la presencia de factores de crecimiento favorece la proliferación y diferenciación en diferentes cultivos celulares, entonces la liberación controlada de un factor de crecimiento incorporado a un compósito de quitosano-hidroxiapatita multilaminar, favorecerá la proliferación y diferenciación de los osteoblastos sobre el compósito.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la liberación controlada del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) desde un compósito de quitosano-hidroxiapatita multilaminar sobre la proliferación y diferenciación de osteoblastos en cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la liberación del factor de crecimiento PDGF-BB desde el compósito de quitosano-hidroxiapatita multilaminar.
2. Evaluar el efecto del factor de crecimiento PDGF-BB en la diferenciación de los osteoblastos cultivados sobre el compósito de quitosano-hidroxiapatita multilaminar.
3. Evaluar el efecto del factor de crecimiento PDGF-BB sobre la viabilidad y proliferación de los osteoblastos cultivados sobre el compósito de quitosano-hidroxiapatita multilaminar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usó un compósito multilaminar de quitosano (2%) más hidroxiapatita (5%), preparado previamente en el CIMAT. Los compósitos se dividieron en 3 grupos:

- **Grupo A:** compósitos multilaminares **sin** factor de crecimiento **con** células osteoblásticas.
- **Grupo B:** compósitos multilaminares **con** factor de crecimiento **con** células osteoblásticas.
- **Grupo C:** compósitos multilaminares **con** factor de crecimiento **sin** células osteoblásticas.

Los compósitos multilaminares fueron cortados a un tamaño aproximado de 5x3x3mm, luego fueron pesados para obtener compósitos con un peso relativamente similar.

Grupo A

Los compósitos multilaminares de quitosano fueron usados para un cultivo *in vitro* de células osteoblásticas por 14 días. Fue evaluada la proliferación y diferenciación celular los días 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo.

Grupo B

A los compósitos se les adicionó el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (R&D®), se realizó un cultivo celular por 14 días y se evaluó la proliferación y diferenciación de los osteoblastos los días 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo. Además, se determinó la liberación del PDGF-BB al medio, en cada cambio de medio de cultivo.

Grupo C

A los compósitos se les adicionó el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), no se realizó cultivo celular, solo estuvieron con el medio de cultivo. En este grupo se determinó la liberación del PDGF-BB al medio, en cada cambio de medio de cultivo.

Adición del factor de crecimiento al compósito

A cada compósito se le adicionó 60 ng de PDGF-BB. Se sabe que cada compósito de 5mg de peso tiene una capacidad de absorción de 30 μ l (6 μ l/mg) aproximadamente, por lo tanto, para obtener esta concentración se colocó en cada compósito 30 μ l que contenían 60 ng de PDGF-BB.

El Grupo A y el Grupo B siguieron los siguientes procesos:

1. Cultivo de osteoblastos

Osteoblastos de la línea MC3T3-E1 (ATCC®), en una concentración de 25.000 células fueron suspendidas en medio de cultivo completo que consiste en α -MEM (Hyclone®) con 15 % de FBS (Hyclone®), 1% solución antibiótica y antimicótica (Thermo®), 10 mM de β -glicerofosfato de sodio (Sigma®), 50 μ g/ml de ácido L-ascórbico (Sigma®) y 10^{-5} M de dexametasona (USP®). Los compósitos porosos fueron colocados en cápsulas de 48 pocillos (un compósito, previamente pesado, por cada pocillo), sabiendo que la capacidad de absorción de los compósitos con las dimensiones previamente descritas es de 30 μ l, por lo tanto el sembrado de las células se realizó con una densidad de 25.000 células/30 μ l de medio/compósito. Los compósitos fueron incubados con las células por 20 minutos a 37° C permitiendo la adhesión de las células al compósito, luego se agregó 1 ml de medio de cultivo completo en cada pocillo. El medio se cambió cada 2-3 días. Los cultivos se mantuvieron con una humedad de 95% y 5% de CO₂ a 37° C, en incubadora (VWR®).

2. Evaluación de la liberación del PDGF-BB para el Grupo B y Grupo C

Para determinar la liberación de PDGF-BB se utilizó un kit ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), que corresponde a una técnica cuantitativa enzimática de inmunoensayo, se basa en la detección de un receptor PDGF R β /Fc inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos policlonales específicos de PDGF-BB, que directamente producen una reacción cuyo producto coloreado es medido espectrofotométricamente. Para esta prueba se tomó una muestra de medio de cultivo en cada cambio de medio (cada 2 a 3 días), el cual se mantuvo congelado hasta el día 14 para su evaluación con el kit ELISA.

3. Proliferación de células osteoblásticas

Para medir la proliferación celular se utilizó el método thiazolil blue tetrazolium bromide (MTT) (Invitrogen ®), el cual se basa en el hecho de que las células viables expresan la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, el MTT mide el metabolismo celular basado en la reducción de esta sal por acción de las succinato-deshidrogenasas mitocondriales, con el consecuente cambio de color amarillo a azul-violeta, cuya producción es proporcional al número de células metabólicamente activas. Se realizó recuento celular los días 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo de la siguiente manera:

Procedimiento: Se retiró el medio de cultivo del pocillo, luego se agregó nuevamente 1 ml de medio de cultivo con 100 µl de MTT al 0,5%, se incubó por 3 horas. Pasado el tiempo se lavó el compósito con una solución salina balanceada (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)) (Hyclone®) para remover las células no adheridas y el medio de cultivo restante. Posteriormente se retiró el compósito y se colocó en un microtubo que contiene 1 ml de solución de lisis, luego se sonicó por 5 minutos. Por último se colocó 200 µl de solución de lisis resultante en un pocillo de placa 96 pocillos para ser leída por un lector de ELISA.

A través de una curva de concentración celular MTT estandarizada previamente, se realizan los ejercicios matemáticos para determinar la cantidad total de células activas que contiene cada compósito.

4. Morfología de los osteoblastos

Las células fueron observadas directamente en los compósitos por medio de microscopio electrónico de barrido (SEM) los días 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo.

Se fijaron los compósitos con glutaraldehído al 3 % (Sigma®) en tampón cacodilato 0,1 M (Ted Pella®) por 12 horas. Posteriormente se lavaron con tampón cacodilato de sodio 0,1 M y fueron deshidratados en acetona (Merck®) en concentración creciente hasta 100 %.

Por último los compósitos fueron sometidos a secado de punto crítico, cubiertos con oro y examinados en el SEM (Tesla® BS343A).

5. Diferenciación de osteoblastos

La diferenciación de los osteoblastos se evaluó a través de dos mediciones: la actividad de fosfatasa alcalina que producen los osteoblastos y la cantidad de calcio depositado en el compósito multilaminar.

5.1. Medición de actividad de fosfatasa alcalina

La actividad de fosfatasa alcalina (ALP) puede ser utilizada como indicador de diferenciación de osteoblastos a osteocitos. La ALP se determinó los días 1, 4, 7, 11 y 14 mediante el método basado en la capacidad de la enzima para convertir el sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) en p-nitrofenol a través de una hidrólisis. El pNPP es un sustrato cromogénico para la mayor parte de las fosfatasas. El producto de la reacción es el p-nitrofenol, un producto amarillo soluble en condiciones alcalinas que puede ser medido espectrofotométricamente a 415 nm en un lector de ELISA.

Procedimiento: Se lavaron los compósitos multilaminares con HBSS, luego cada uno fue colocado en un microtubo con 0,5 ml de Triton X-100 0,2% (Sigma®), se dejaron por 20 minutos a 37° C, provocando la lisis celular. Después del tiempo transcurrido, 50 µl de la solución de lisis resultante fue colocada en un pocillo de placa ELISA. Posteriormente se agregó a cada pocillo 100 µl de solución de fosfatasa alcalina que contiene: 78 µl de agua desionizada, 2 µl de fosfato p-nitrofenol (PNPP) 15 mM (Calbiochem®) y 20 µl de tampón p-nitrofenil (Calbiochem®) al 10%. Finalmente se midió en un lector de ELISA a una absorbancia de 415 nm. Para medir la producción de p-nitrofenol (PNP) dada por la actividad de la fosfatasa alcalina en las células lisadas, se realiza la medición en tiempo 1 y 25 min. Una vez realizadas las mediciones se agregó 100 µl NaOH 1M a los 30 min., con el objeto de detener la reacción de la enzima.

La variación de la absorbancia versus el tiempo de cultivo fueron usados para calcular la curva de la actividad de la enzima.

Como control se realizó la misma prueba a células cultivadas solo con medio de cultivo completo sin la presencia del compósito, midiendo los días 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo.

5.2. Análisis de mineralización del compósito

La cantidad de calcio depositado en los compósitos fue medida cuantitativamente los días 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo, usando espectrofotometría de absorción atómica (AA), instrumento perteneciente al Laboratorio de Nutrición Animal. Este método consiste en quemar la muestra y después medir la cantidad de luz absorbida después de pasar a través de la llama, lo que determina la cantidad del mineral en la solución. Para este fin se realizó una hidrólisis del compósito completo usando 1 ml de HCL 6M (Merck®) a 108° C por 24 horas. Después se realizó una dilución de la solución resultante con cloruro de lantano 0,5% y finalmente se procedió a la lectura en el AA.

Como control se midió el calcio total en compósitos que contaban sólo con medio de cultivo completo sin osteoblastos, los días 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo.

5.3 Examen histológico de los compósitos porosos multilaminares de quitosano cultivados in vitro

Se realizó los días de cultivo 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo. Se lavaron los compósitos con HBSS, luego se fijaron con formalina 10%. Posteriormente se realizaron cortes de 5 µm, que fueron teñidos con hematoxilina/eosina para visualizar las células. También se utilizó el método de tinción de nitrato de plata de von Kossa para demostrar la mineralización del compósito en forma cualitativa (el calcio depositado se observó con un tinte negro-café). Todos los preparados fueron examinados con microscopio de luz.

Análisis Estadístico

Estadística Descriptiva: con los datos obtenidos se realizaron medidas de resumen y tablas de frecuencia para las variables de proliferación, actividad de fosfatasa alcalina y análisis de calcio. Se obtuvo el tamaño muestral óptimo para los Análisis de varianza (ANDEVA) por medio de la aplicación del software estadístico InfoStat.

RESULTADOS

1. Evaluación de la liberación del PDGF-BB para el Grupo B y Grupo C

1.1. Curva estándar de factor de crecimiento PDGF-BB

Para evaluar la liberación del factor de crecimiento PDGF-BB se utilizó un kit ELISA “sandwich”, siendo necesario realizar una curva estándar de PDGF-BB en concentraciones de pg.

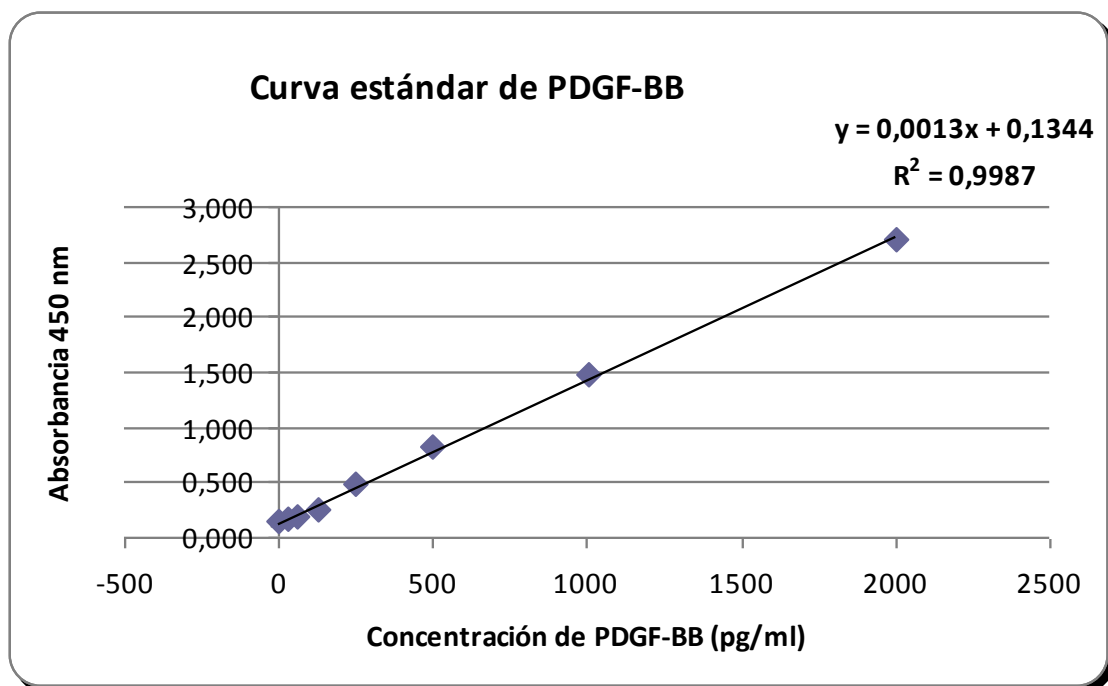


Figura 1. Curva estándar del factor de crecimiento PDGF-BB de kit ELISA.

La figura 1 muestra que la concentración de PDGF-BB es directamente proporcional a la absorbancia resultante de la densidad óptica dada por la reacción.

1.2. Medición del factor de crecimiento PDGF-BB liberado desde el compósito al medio de cultivo.

Se realizaron dos ensayos con diferentes concentraciones iniciales de factor: **Ensayo A:** con una concentración inicial de 60 ng (60.000 pg), diluidos en 30 μ l de agua desionizada, colocados en compósitos de peso promedio de 5 mg. **Ensayo B:** con una concentración inicial de 40 ng (40.000 pg), diluidos en 22 μ l de agua desionizada en compósitos de peso promedio de 3, 5 mg.

En el Ensayo A, se calculó la cantidad del factor de crecimiento liberado de los compósitos tanto del grupo B, cultivados con células osteoblásticas, como del grupo C, compósitos sin células. Los días de evaluación fueron 1, 4, 7, 9, 11, 14 y 17 días de cultivo. Excepcionalmente en este ensayo se hizo hasta el día 17 de cultivo.

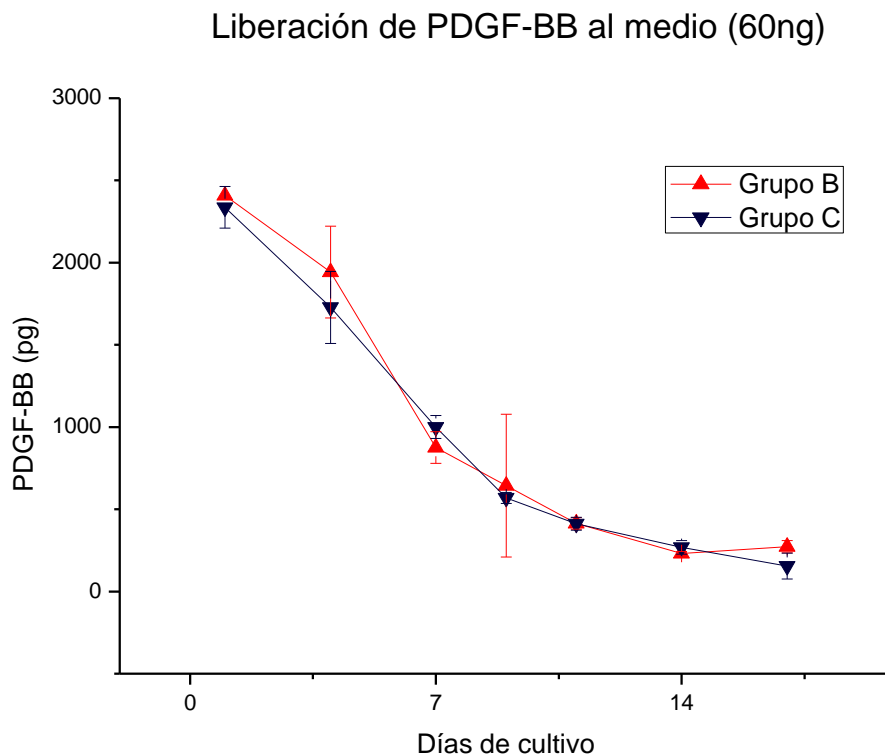


Figura 2. ENSAYO A: Curva de liberación de factor de crecimiento PDGF-BB desde compósitos al medio de cultivo. Grupo B, compósitos sembrados con células osteoblásticas y Grupo C, sin células en su interior. Ambos grupos con una cantidad inicial de factor de crecimiento de 60 ng (60.000 pg). La cantidad total liberada hasta el día 17 de cultivo fue de 6.787 pg para el Grupo B y 6.468 pg para el Grupo C.

En este gráfico se observa que en ambos grupos la tendencia de liberación del factor al medio de cultivo es similar, con una cantidad mayor del factor los primeros días de cultivo, disminuyendo en forma paulatina hasta valores cercanos a cero hacia el día 17 del ensayo A. La cantidad del factor PDGF-BB liberada al medio el primer día fue de 2.300 pg, siendo la cantidad inicial de 60.000pg. La cantidad total de factor de crecimiento liberada hasta el día 17 de cultivo, fue de 6.787 pg para el Grupo B y 6.468 pg para el Grupo C.

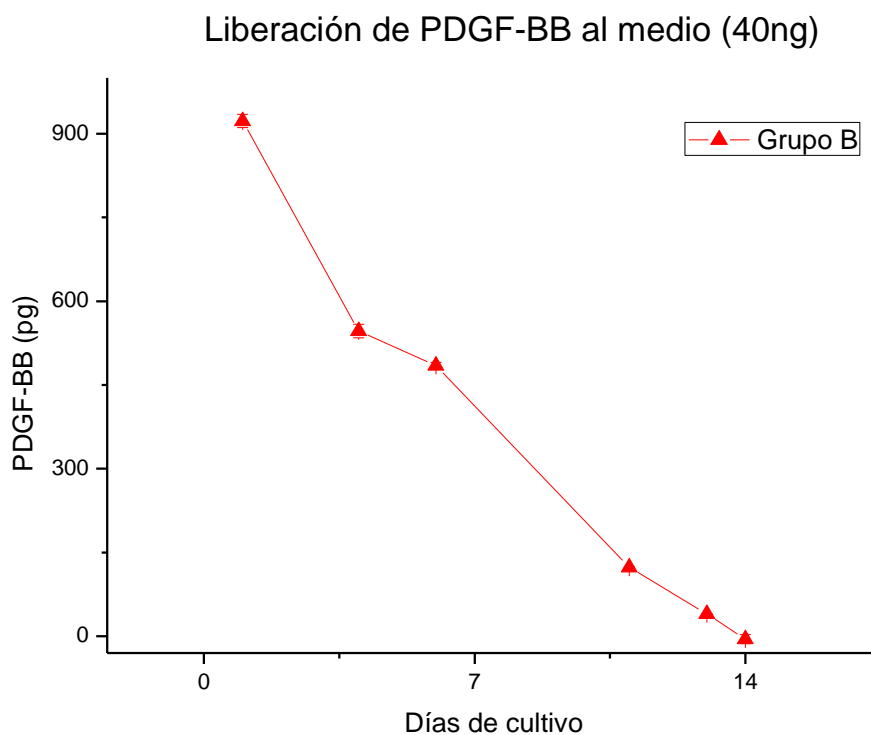


Figura 3. PRUEBA B: Curva de liberación de factor de crecimiento PDGF-BB desde compósitos al medio de cultivo. Grupo B, compósitos sembrados con células osteoblásticas con una cantidad inicial de factor de crecimiento de 40.000 pg. La cantidad total de factor PDGF-BB liberado hasta el día 14 de cultivo fue de 2.212,4 pg

La figura 3, muestra el gráfico del ensayo B, donde se observa la curva de liberación del factor PDGF-BB con tendencia similar al ensayo A. La cantidad liberada el primer día de ensayo cercano a los 900 pg, número menor que el ensayo B, ya que la cantidad inicial fue de 40.000 pg. La cantidad total de factor de crecimiento PDGF-BB liberado hasta el día 14 de cultivo fue de 2.212,4 pg

2. Proliferación de células osteoblásticas

Para el conteo de osteoblastos metabólicamente activos dentro del compuesto fue utilizado el método MTT.

Fue necesario realizar una curva estándar con un número de células osteoblásticas conocido para utilizar la ecuación de la recta resultante en los ensayos posteriores.

2.1. Curva estándar de proliferación de osteoblastos usando método MTT.

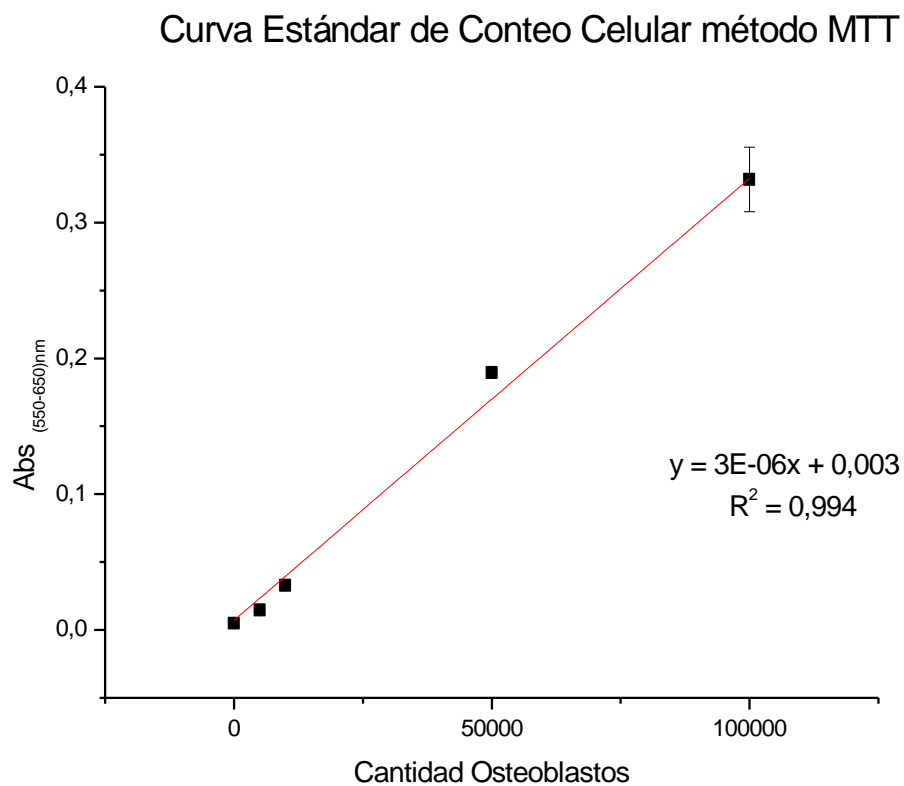


Figura 4. Curva estándar de Proliferación Celular, utilizando el método MTT que contabiliza las células metabólicamente activas, siendo a la vez una prueba de viabilidad.

En la figura 4, se observa la curva estándar resultante de proliferación celular con el método MTT, utilizando un número conocido de células osteoblásticas: 5.000, 10.000, 50.000 y 100.000.

2.2. Proliferación de osteoblastos dentro de los compósitos del grupo A y grupo B.

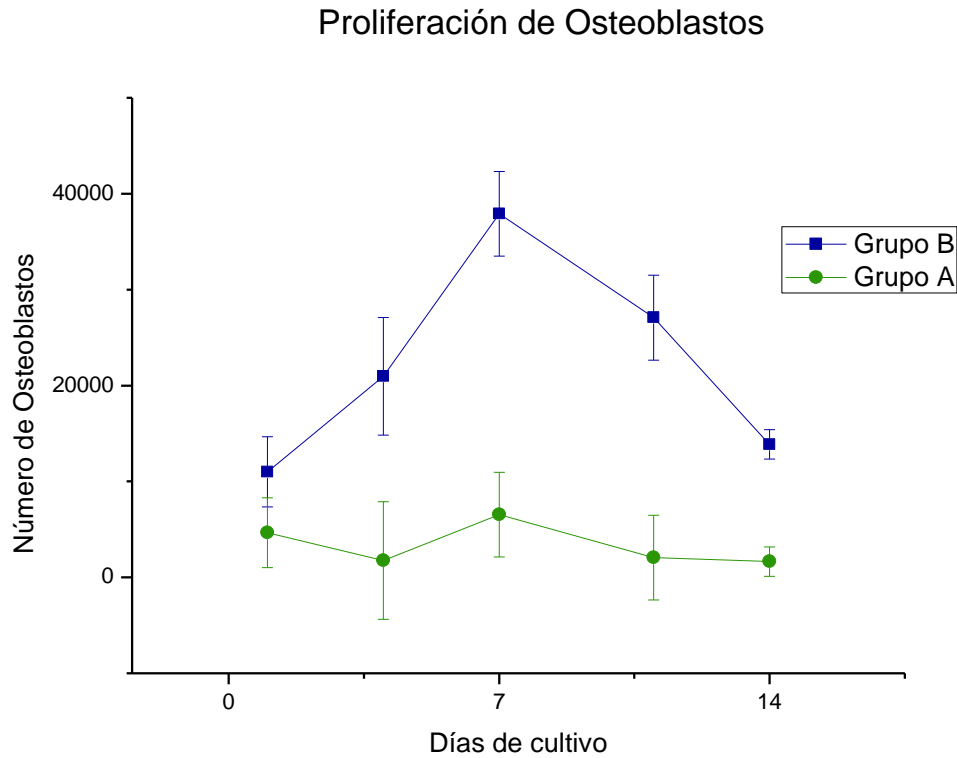


Figura 5. Curvas de Proliferación de células osteoblásticas para los Grupos A y B durante los días 1, 4, 7, 11 y 14 de cultivo.

La figura 5 muestra una diferencia significativa de la proliferación celular entre el grupo A y B. El grupo B, que contiene el factor de crecimiento PDGF-BB, aumentó considerablemente la cantidad de osteoblastos en el día 7 de cultivo, llegando a las 40.000 células osteoblásticas aprox. en comparación a las 13.000 del grupo A para el mismo día de cultivo.

3. Diferenciación celular

Se analizó la diferenciación celular a través de tres ensayos: actividad de fosfatasa alcalina y análisis del depósito de calcio, ambas pruebas cuantitativas, y examen histológico del compósito, prueba cualitativa.

3.1. Actividad de fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina corresponde a una enzima indicadora de diferenciación celular, en este ensayo se evaluó su actividad durante los días de cultivo, es decir, su variación en cantidad a través del tiempo. Y en forma conjunta se analizó la diferencia entre el grupo A y B.

Fue necesario realizar una curva estándar de fosfata alcalina en concentraciones conocidas (UI), para utilizar la ecuación resultante en los ensayos posteriores.

3.1.1. Curva estándar de fosfatasa alcalina

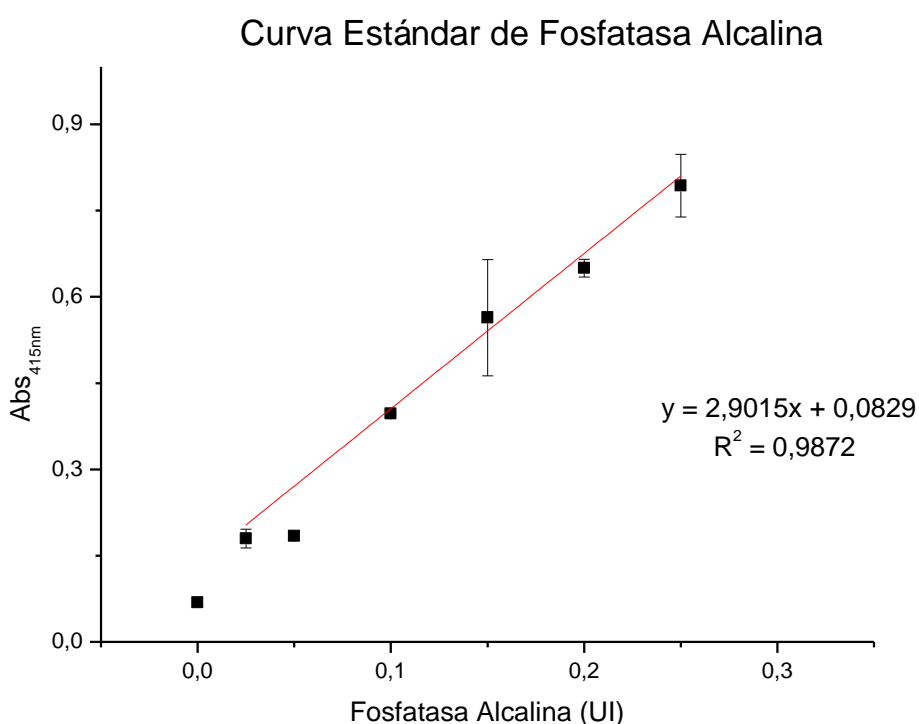


Figura 6. Curva estándar de Fosfatasa alcalina (UI) calculado en densidad óptica con 415 nm de absorvancia. A los 25 minutos de la reacción.

La figura 6 muestra la curva estándar correspondiente a la fosfatasa alcalina, utilizando concentraciones conocidas: 0,02, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 y 0,3. Se midió la absorbancia a los 25 minutos de la reacción.

3.1.2 Actividad de fosfatasa alcalina para los grupos A y B.

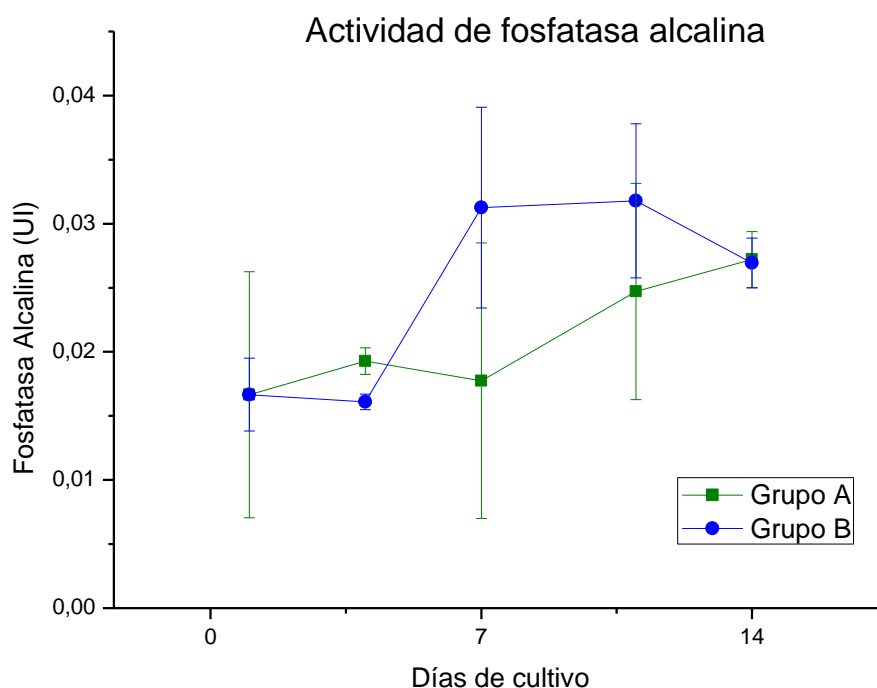


Figura 7. Curva de Actividad de Fosfatasa Alcalina en los grupos A y B durante los días de cultivo 1, 4, 7, 11 y 14.

La dinámica de la actividad de fosfatasa alcalina es similar para el grupo A como para el grupo B, ambos aumentan en el transcurso del período de cultivo (figura 7). Aparentemente la cantidad de fosfatasa alcalina es mayor en el grupo B, que contiene el factor de crecimiento PDGF-BB con respecto al grupo A que no lo contiene, pero la diferencia no es significativa.

Para verificar que la fosfatasa alcalina aumenta por una mayor diferenciación celular y no por un alza en la proliferación de osteoblastos, se elaboró una nueva curva que incluye la relación entre estos dos parámetros, proliferación celular y fosfatasa alcalina, tanto para el grupo A como el grupo B.

3.1.3. Variación de actividad fosfatasa alcalina y proliferación osteoblásticas en el grupo A.

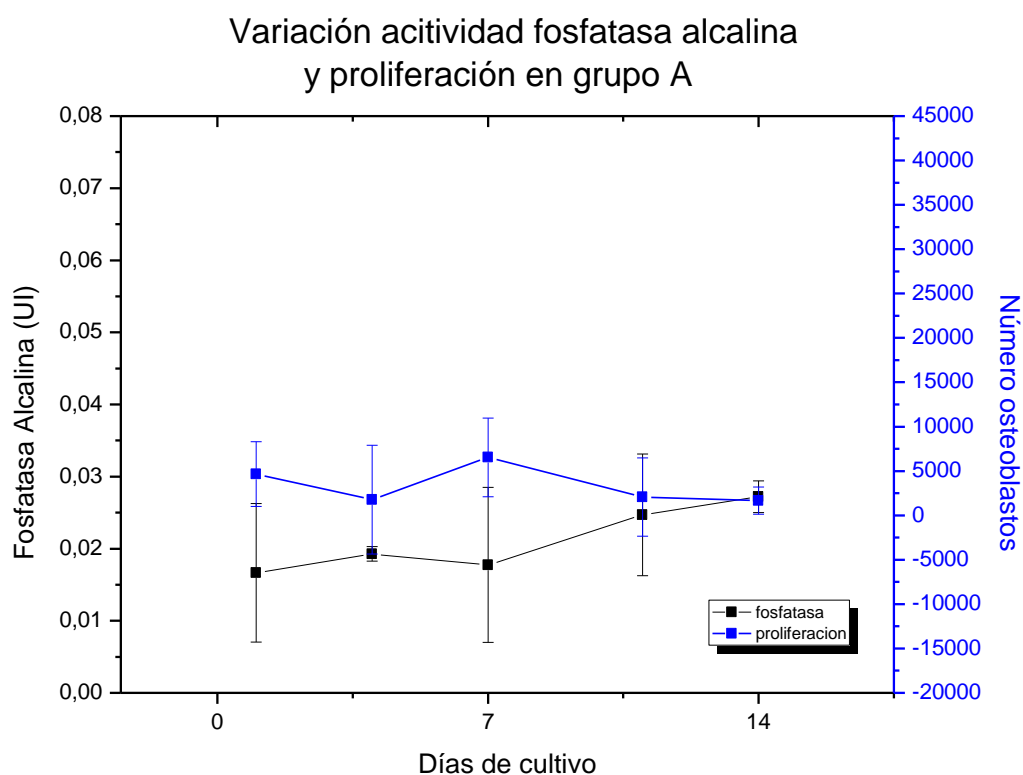


Figura 8. Relación entre Proliferación celular y Actividad de Fosfatasa Alcalina para los mismos días de cultivo para el grupo A.

En el grupo A se observa que la cantidad de fosfatasa alcalina es mayor en los últimos días de cultivo, ya que la proliferación es más baja que en el día 1.

3.1.4. Variación de actividad fosfatasa alcalina y proliferación osteoblásticas en el grupo B.

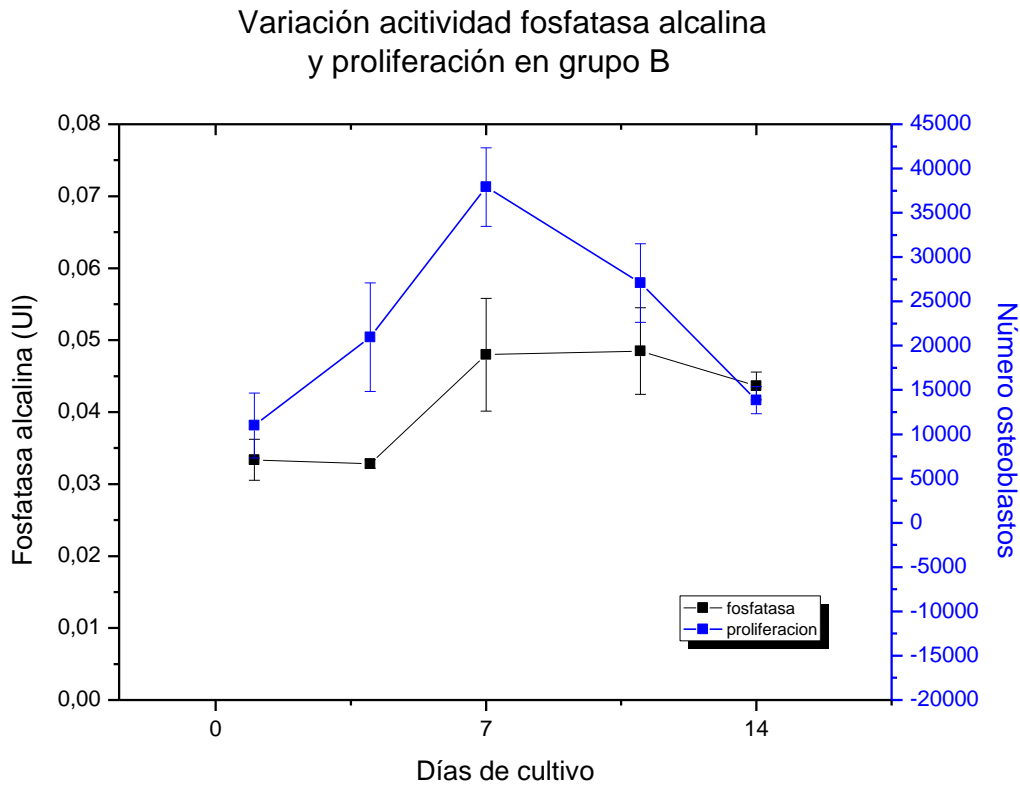


Figura 9. Relación entre Proliferación celular y Actividad de Fosfatasa Alcalina para los mismos días de cultivo para el grupo B.

En tanto en el grupo B, la actividad de fosfatasa alcalina es mayor en el día 14 de cultivo, donde la proliferación de osteoblastos es baja (figura 9). En el día 7 de cultivo donde se observa la mayor cantidad de fosfatasa alcalina se relaciona por el aumento celular que también ocurre ese día. Por lo tanto, se puede inferir que la diferenciación celular es mayor en al final del período de cultivo y además es mayor en el grupo B con respecto al grupo A.

3.2. Análisis cuantitativo de calcio

Otra prueba de diferenciación celular es el depósito de calcio en el compósito por los osteoblastos para formar la matriz ósea. En este caso se analizó la cantidad de calcio total que contenía cada compósito, con el fin de observar las diferencias durante el tiempo de cultivo y entre los grupos A y B.

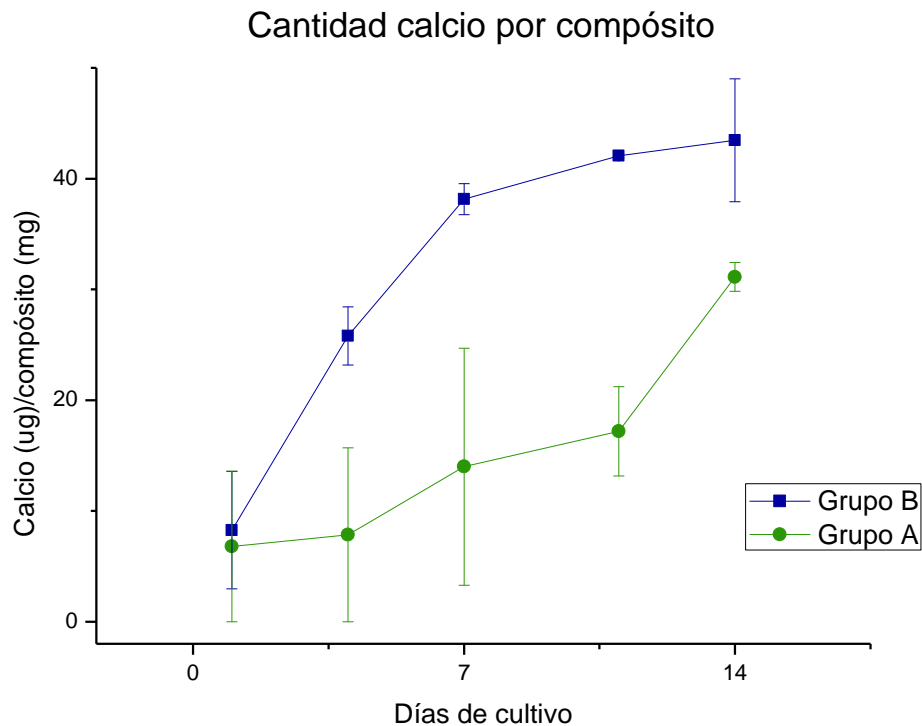


Figura 10. Curva Análisis de Calcio. Cantidad de calcio medida en espectrofotómetro para grupo A y B.

En ambos grupos A y B, la cantidad de calcio depositada en el compósito aumenta en el transcurso del ensayo, como muestra la figura 10. Se observa una diferencia significativa entre los grupos, siendo el grupo B el que contiene mayor cantidad de calcio llegando a los 40 ug de calcio por mg de compósito el día 14 de cultivo, siendo solo 30 ug de calcio por mg para el grupo A para el mismo día de cultivo.

3.4. Análisis histológico

Corresponde a una prueba cualitativa mediante cortes histológicos del compuesto de quitosano- hidroxiapatita tratados con dos tinciones diferentes: hematoxilina-eosina (HE), para observar la presencia de los osteoblastos y von Kossa, que destaca el depósito de calcio en el compuesto.

3.4.1. Tinción HE

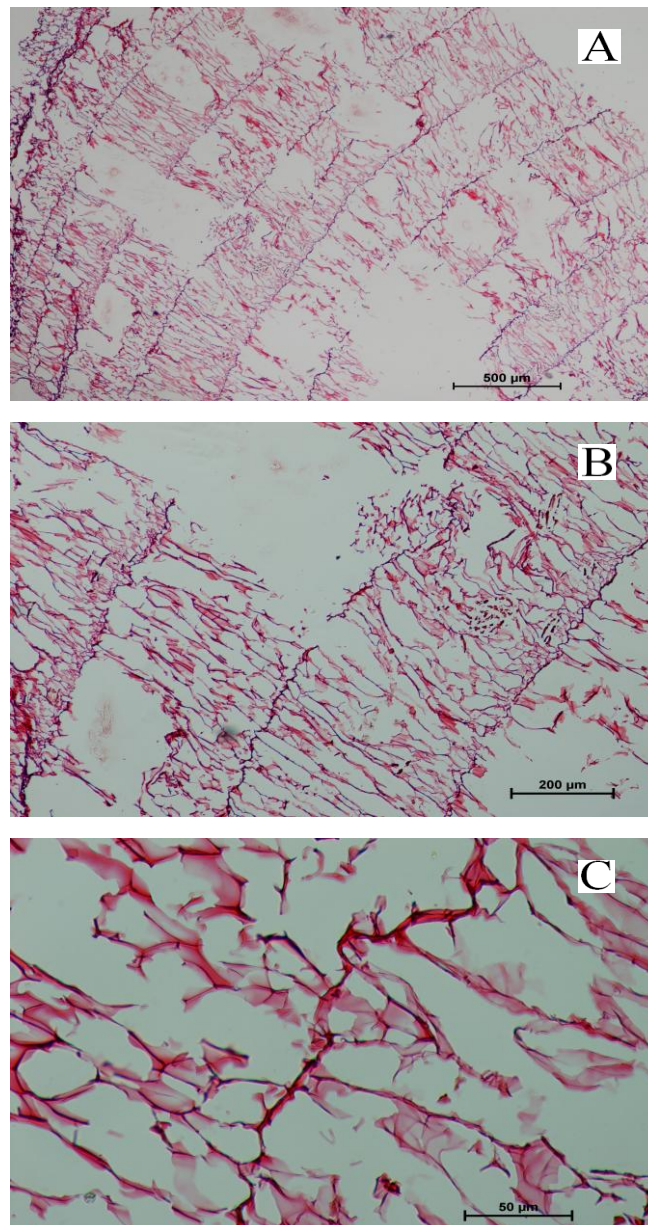


Figura 11. Control corte histológico de compuesto sin células, tinción HE. Aumento 4x (A), 10x (B) y 40x (C).

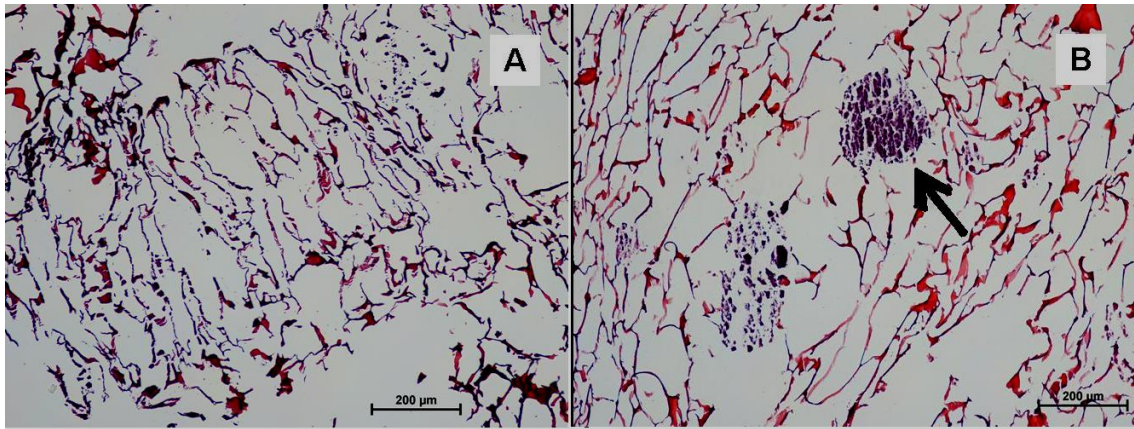


Figura 12. Corte histológico. Tinción HE. Compósito sin factor de crecimiento PDGF-BB (A) y compósito con factor de crecimiento PDGF-BB. Día 14 de cultivo. En aumento 10x. La flecha de la imagen B señala células osteoblásticas aglomeradas.

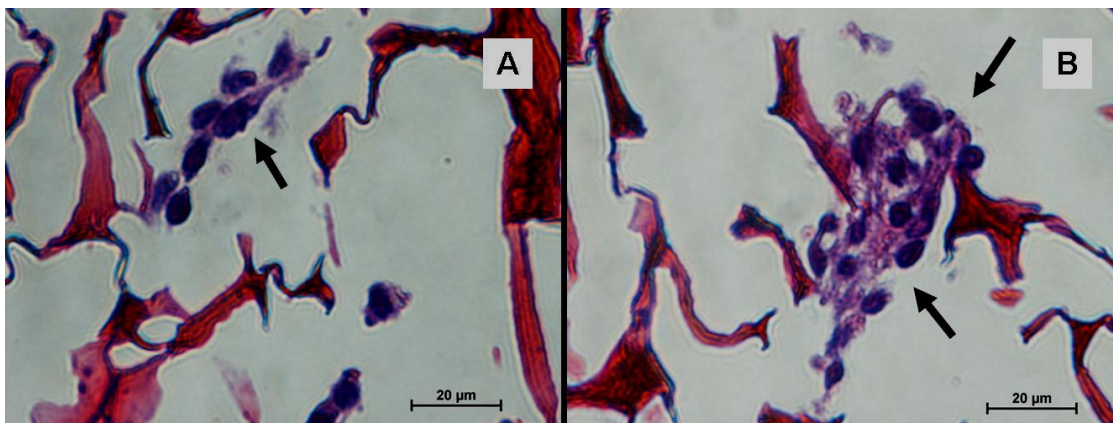


Figura 13. Corte histológico. Tinción HE. Compósito sin factor de crecimiento (A) y compósito con factor de crecimiento PDGF-BB (B). Día 4 de cultivo. Aumento 100x. Las flechas, tanto en la imagen A como B, indican osteoblastos con sus formas alargadas y su núcleo bien marcado.

En la figura 12 y 13 se observan los osteoblastos dentro del compósito de quitosano-hidroxiapatita. Osteoblastos con sus prolongaciones adheridas a la superficie de este implante. Las imágenes B de cada figura muestran una mayor aglomeración de células osteoblásticas dentro de los compósitos que contienen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB).

3.4.2. Tinción von Kossa

Los cortes histológicos fueron tratados con tinción von Kossa, para demostrar la mineralización del compósito en forma cualitativa.

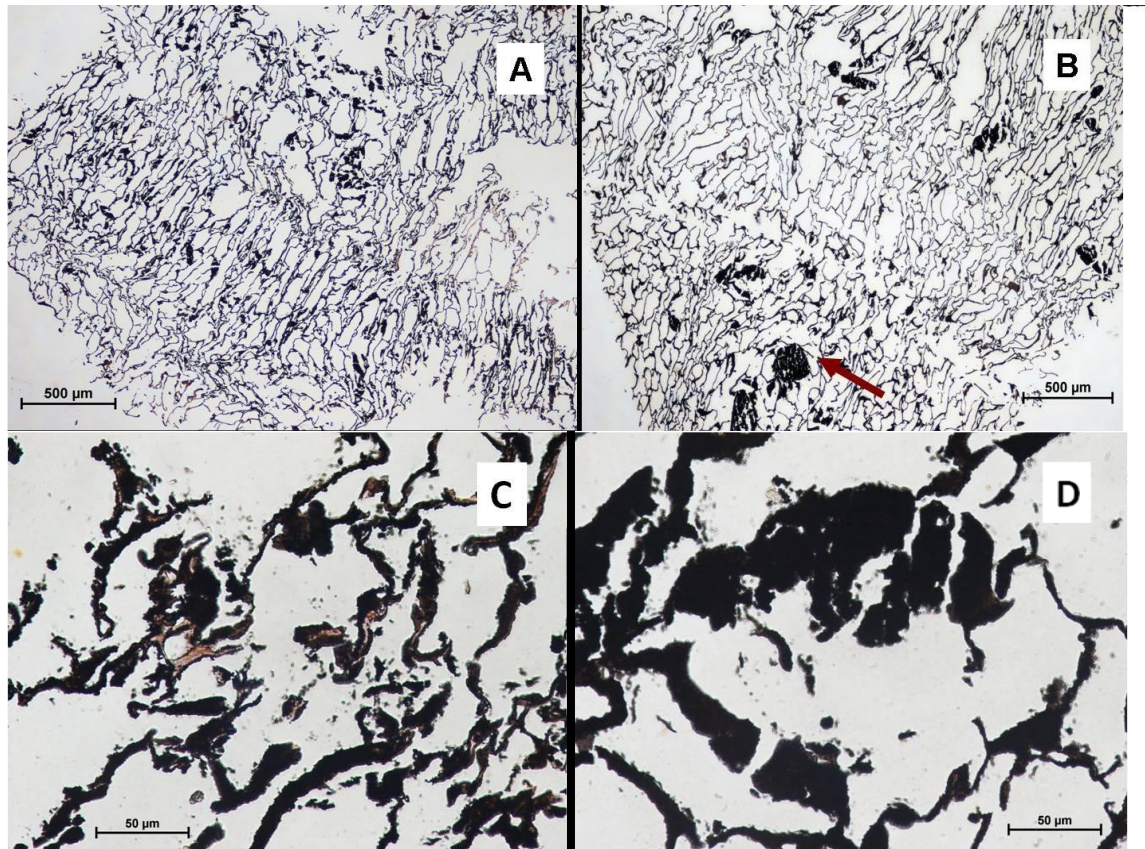


Figura 14. Corte histológico. Tinción von Kossa. Compósito sin factor de crecimiento PDGF-BB (A) y (C); y compósito con factor de crecimiento PDGF-BB (B) y (D). Día 14 de cultivo. Las imágenes A y B en Aumento 4x. Las imágenes C y D en aumento 40x. En la imagen B la flecha señala un mayor depósito de calcio en el compósito con factor de crecimiento PDGF-BB.

4. Morfología Celular

Por medio de SEM se observó al compuesto, visualizando sus estructuras, multilaminas y porosidad. Además, mostró las células osteoblásticas adheridas a la superficie del compuesto.

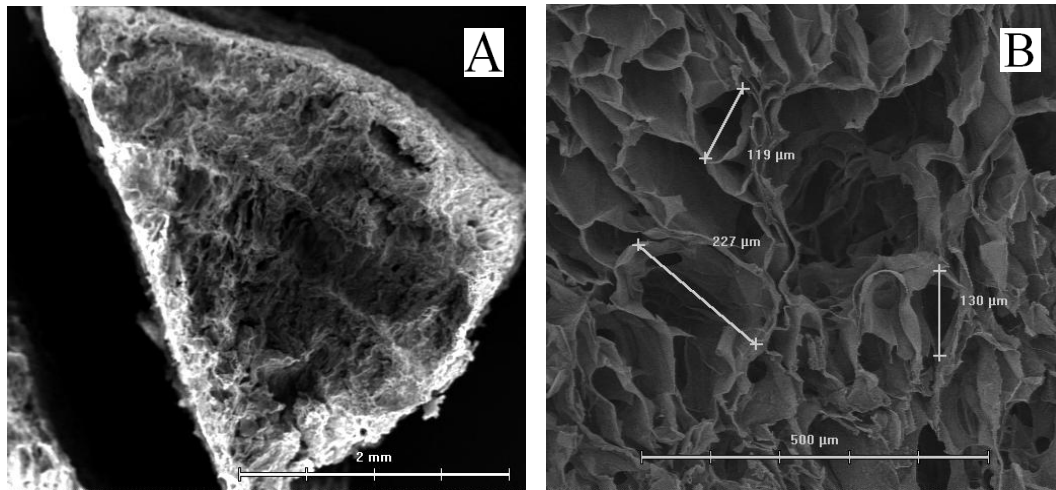


Figura 15. Imagen SEM. Compósito multilaminar

En la figura 15 se observa el compuesto de quitosano e hidroxiapatita en su forma multilaminar en aumento 67x (imagen A). La imagen B, en aumento 170x muestra la porosidad presente en el compuesto superando los 100 µm de diámetro, presentando un tamaño adecuado para la osteoconducción.

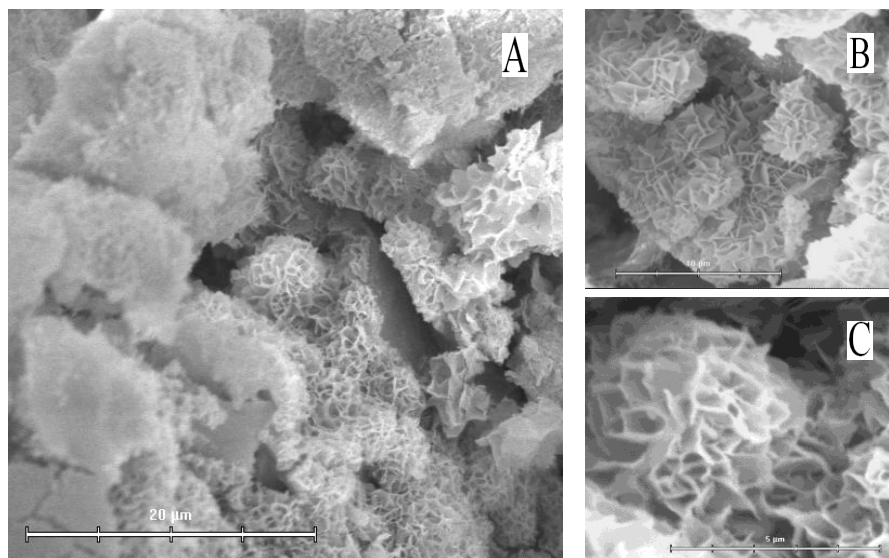


Figura 16. Imagen SEM, depósitos de hidroxiapatita dentro del compuesto en diferentes aumentos 3.300X (A), 6.700X (B) y 17.000X (C).

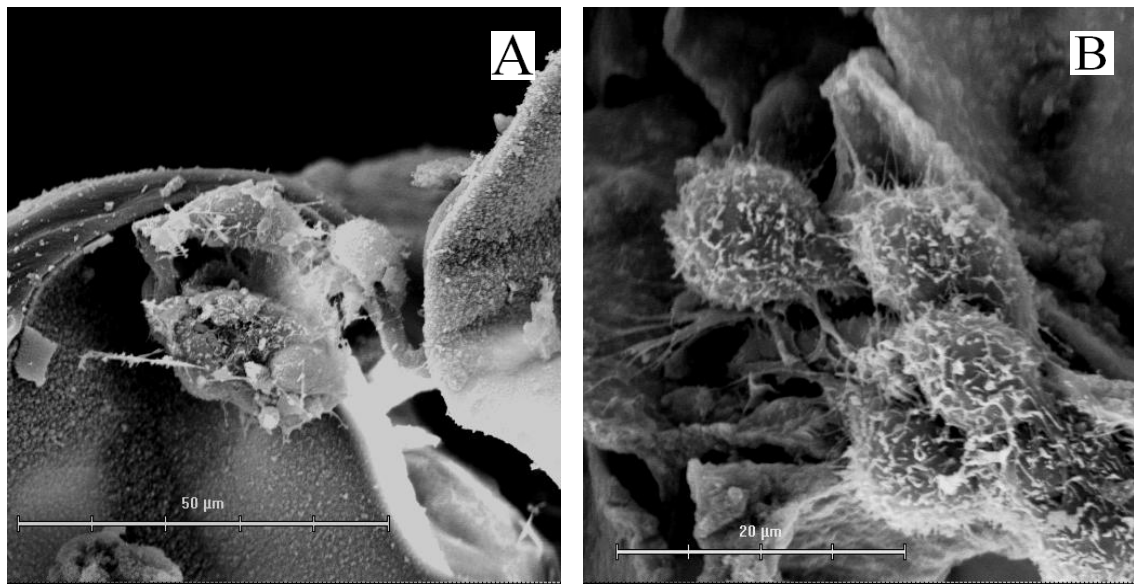


Figura 17. Imagen SEM. Muestra la presencia de células osteoblásticas dentro del compuesto de quitosano- hidroxiapatita tanto en el grupo A (A) como en el grupo B (B). En aumento 1.700X 3.300X, respectivamente. Día 1 de cultivo.

La figura 17 muestra osteoblastos dentro del compuesto de quitosano en el día 1 de cultivo. En ambas imágenes se observa sus prolongaciones adhiriéndose a la superficie del implante multilaminar.

DISCUSIÓN

El PDGF-BB aumenta la mitogénesis y la quimiotaxis de las células óseas en proporción a su concentración de 0.1 a 100 ng / ml. Se sabe que la constante liberación de PDGF-BB dentro de su rango terapéutico sería muy ventajoso para la regeneración ósea incluyendo la migración de osteoblastos y la proliferación en un período crítico de tiempo (Lee *et al*, 2002). Sin embargo, debido a la rápida eliminación *in vivo* y a la incapacidad para mantener una concentración terapéutica en el tiempo, los estudios anteriores en animales han aplicado muy altas dosis de PDGF-BB (por encima de 10 ug / ml) en los sitios tratados. Según Lee *et al*, (2000 a), la vida media de PDGF-BB es de 4,2 horas, por lo tanto, la liberación controlada de este factor de crecimiento es necesaria para el mantenimiento de una concentración terapéutica eficaz. Una consideración importante para la terapia con factor de crecimiento es el método de entrega o material de soporte (Lee *et al*, 2000 a).

Con respecto a la medición del factor de crecimiento PDGF-BB liberado desde el compósito al medio de cultivo, autores como Lee *et al*, (2002) han usado el método de I₁₂₅.

En esta memoria de título se utilizó un kit ELISA tipo sandwich, el cual por medio de inmunodetección permitió calcular la cantidad de factor de crecimiento liberado al medio de cultivo desde los compósitos de hidroxiapatita-quitosano.

En el estudio de Lee *et al*, (2002), los compósitos de quitosano tenían una cantidad inicial de factor de crecimiento de 200 ng. La liberación inicial fue de 140 ng aproximadamente el primer día de cultivo. En el caso de compósitos con condroitin sulfato (CS), la liberación fue menor y más constante, al aumentar el porcentaje de CS en el compósito, la liberación fue menor y más prolongada. Con respecto a los compósitos quitosano-PLLA la liberación es más prolongada en comparación con los compósitos de quitosano.

También Lee *et al*, (2000 a), comprobaron que compósitos de quitosano-fosfato tricálcico (CHI-TCP) liberaban de 2 a 6 ng por día hasta los 21 días de cultivo.

En el caso de esta memoria, en la figura 2, correspondiente al ensayo A (60.000 pg de factor de crecimiento inicial), se demostró que no hay una diferencia significativa en la cantidad de factor de crecimiento PDGF-BB liberado al medio de cultivo, entre los compósitos con células (grupo B) y los compósitos sin osteoblastos en su interior (grupo C). Es decir, ambos grupos liberaron la misma cantidad de factor de crecimiento al

medio de cultivo, lo esperado era una menor cantidad de PDGF-BB liberado al medio de cultivo por los compósitos del grupo B, siendo las células osteoblásticas adheridas al compósito las que usarían el factor de crecimiento PDGF-BB, produciéndose un aumento en proliferación y diferenciación, al parecer el efecto del factor de crecimiento se produce indirectamente a través de su presencia en el medio de cultivo. Como se reportó previamente en un estudio de Lee *et al*, (2002), donde aumentó la proliferación osteoblástica en presencia del factor de crecimiento PDGF-BB incluido en compósitos de quitosano.

Con respecto a la curva de liberación de factor de crecimiento PDGF-BB, al medio de cultivo, ambos ensayos A y B, mostraron una tendencia similar (figura 2-3). Sin embargo, la cantidad liberada en ambos ensayos, fue notoriamente menor en relación a la concentración colocada inicialmente, 60.000 pg para el ensayo A y 40.000 pg para el ensayo B. A pesar de estos resultados, se obtuvo una diferencia significativa en proliferación y diferenciación celular con la presencia del factor de crecimiento PDGF-BB en los compósitos, lo que demuestra su efecto estimulador sobre las células presentes en el compósito.

Para medir la proliferación, Lee *et al*, (2002) utilizó el conteo con hemocitómetro, siendo este un método que probamos en esta memoria, y que resultó poco eficiente, ya que no todas las células se despegaban del compósito, por eso se eligió el método MTT, que contabiliza las células metabólicamente activas que se encuentran dentro del compósito sin la necesidad de pasar por un paso traumático como la centrifugación, ni es necesario despegarlas de la superficie del compósito para contarlas. Con respecto a los resultados obtenidos por Lee *et al*, (2002), hay que considerar que el tamaño de esos compósitos de quitosano porosos fue de 10x10x1 mm (3 veces más grandes que los ocupados en esta tesis) y por esta razón, la cantidad inicial de células sembradas por ellos fue mayor, de 10^5 células/compósito y la cantidad de factor colocado también fue mayor, de 2.000.000 pg/compósito en comparación a esta memoria de $2,5 \times 10^3$ células/compósito y 60.000 pg de PDGF-BB/compósito. Este ensayo demostró una mayor proliferación en compósitos con factor de crecimiento PDGF-BB, también una mayor proliferación en compósitos que contenían una mayor cantidad de quitosano (ambos medidos a los 1 y 7 días de cultivo).

Con respecto a lo observado en esta memoria, los compósitos con factor de crecimiento PDGF-BB (grupo B), mostraron un aumento significativo en la proliferación de osteoblastos durante todo el ensayo (figura 5). No así los compósitos sin factor PDGF-

BB (grupo A) que mantuvo su población osteoblástica inicial. Este aumento importante de células osteoblásticas para el grupo B, se debería principalmente a la liberación constante del factor de crecimiento PDGF-BB desde el compósito al medio de cultivo más que al traspaso directo desde el compósito al osteoblasto, provocando así un aumento en la tasa metabólica en proliferación y diferenciación celular. Si se considera la liberación total del factor de crecimiento, en los compósitos donde se colocó inicialmente 60.000 pg de factor de crecimiento, se observa que tanto en los compósitos con células como en los compósitos sin células, la cantidad total de factor de crecimiento liberada al medio durante los 17 días que duró el cultivo, es de un 10% de la cantidad total colocada inicialmente en el compósito. Esto se podría explicar a la corta vida media de 72 -120 hrs. que presenta *in vitro* del factor de crecimiento PDGF-BB, siendo posible que parte de la cantidad liberada se haya degradado (McCarrel y Fortie, 2009).

Dentro de las pruebas de diferenciación celular está la actividad de fosfatasa alcalina. Seol *et al*, (2004) probaron la diferenciación osteoblástica en compósitos de quitosano porosos usando el método p-nitrofenilo medido en función del tiempo de 30 min, el mismo utilizado en esta tesis, sin embargo se calculó en base a una cantidad fija de células (10^4 células/compósito), método que en esta memoria no se usó porque en el método MTT las células son lisadas por lo cual no pueden ser usadas posteriormente para el método p-nitrofenilo. Seol *et al*, (2004) obtuvieron una diferencia significativa en la actividad de fosfatasa alcalina durante el tiempo, es decir hubo un aumento durante los 56 días de cultivo.

Otra manera de ver la proliferación celular, aunque es una prueba cualitativa, es el análisis histológico con la tinción HE, en ambos grupos se pudo demostrar la presencia de los osteoblastos dentro del compósito, como muestran las figuras 12 y 13. Se puede observar sutilmente una mayor aglomeración de células osteoblásticas en el grupo con factor de crecimiento como indican las flechas de la figura 12 (B) y figura 13 (B). Los osteoblastos se muestran con su forma alargada y su núcleo muy marcado, adheridos a la superficie de la estructura de este compósito de quitosano- hidroxiapatita, muy parecido a la imagen mostrada en el estudio de Seol *et al*, 2004. Lo que demuestra el efecto del factor de crecimiento PDGF-BB en la proliferación osteoblástica.

En esta tesis se comparó la actividad de fosfatasa alcalina en compósitos sin factor de crecimiento PDGF-BB (grupo A) y compósitos con este factor (grupo B). Para ambos grupos la actividad de fosfatasa alcalina fue similar, como se observa en la figura 7, mostrando un aumento durante los días de cultivo, siendo el valor más alto el día 11. Sin embargo, la diferencia entre ambos grupos no fue significativa, por las desviaciones estándares elevadas al ser un ensayo en duplicado. Es posible que la diferencia de fosfatasa alcalina se de en ensayos con un periodo de tiempo mayor a 14 días de cultivo. Para verificar que la fosfatasa alcalina aumenta por una mayor diferenciación celular y no por un alza en la proliferación de osteoblastos, se elaboraron nuevas curvas que incluyen la relación entre estos dos parámetros, proliferación celular y fosfatasa alcalina, tanto para el grupo A (sin factor) como el grupo B (con factor).

En los compósitos sin factor de crecimiento (grupo A), del día 1 al 7 de cultivo, la fosfatasa alcalina aumentó debido al aumento en el número celular, como se observa en la figura 8. Para el día 11 y 14, la cantidad de fosfatasa alcalina aumentó y los osteoblastos bajaron su población, es decir, hubo una mayor diferenciación celular, dado por un aumento en la producción de fosfatasa alcalina por los osteoblastos. Para el grupo B (compósitos con factor de crecimiento PDGF-BB), se observó la misma tendencia de variación que el grupo A (figura 9), para los mismos días de cultivo. Al colocar ambos grupos en un gráfico con la misma escala, se puede observar que el grupo B estaría más arriba, ya que tiene valores más altos de proliferación y de fosfatasa alcalina que el grupo A. Esta diferencia se debería a la liberación constante del factor de crecimiento PDGF-BB en los compósitos del grupo B.

Otra prueba de diferenciación osteoblástica es el depósito de calcio. En el estudio Seol *et al*, (2004) midieron la cantidad de calcio en compósitos de quitosano porosos, de peso 5 mg y volumen 5x5x1 mm. Sólo se calculó la cantidad de calcio en el tiempo, presentando un aumento significativo durante los 56 días de cultivo. El día 1 de cultivo el compósito contenía 8.89 µg de calcio y para el día 14, presentaba 21 µg de calcio por compósito. Con respecto a los resultados de esta memoria la cantidad de calcio fue mayor y el objetivo fue comparar entre el grupo sin factor de crecimiento (A) y el grupo con factor de crecimiento PDGF-BB (B).

Ambos grupos A y B, mostraron una tendencia positiva, es decir, aumentaron la cantidad de calcio durante los días de cultivo (figura 10). Observándose también una diferencia significativa entre ambos, siendo el grupo B el que contiene los valores más altos de calcio llegando a los 40 ug de calcio por mg de compósito el día 14 de cultivo,

siendo solo 30 ug de calcio por mg para el grupo A para el mismo día de cultivo. Esto se explicaría por el efecto del factor de crecimiento PDGF-BB liberado desde los compósitos del grupo B. Estos resultados coinciden con el aumento de la actividad de fosfatasa alcalina en ambos grupos, más en el grupo con factor de crecimiento PDGF-BB.

El examen histológico que complementa la diferenciación celular, aunque es una prueba cualitativa, corresponde a la tinción de von Kossa, ésta demostró un mayor precipitado de calcio en los compósitos del grupo B, con factor de crecimiento, como muestra la figura 14, demostrando una mayor diferenciación de los osteoblastos sembrados en un compósito que libera constantemente el factor de crecimiento PDGF-BB al medio de cultivo, provocando un aumento en la producción de la matriz ósea, confirmando lo observado en otros estudios como Seol *et al* (2004) y Lee et al, (2002).

La última prueba realizada en esta tesis fue el análisis mediante SEM de los compósitos sin factor de crecimiento (grupo A) y de los compósitos con factor de crecimiento (grupo B). Básicamente fue una prueba demostrativa, en la cual se observó la estructura del compósito, las multiláminas y el precipitado de hidroxapatita (figura 15 y 16), la figura 17 muestra las células osteoblásticas, distinguiéndose las prolongaciones propias de los osteoblastos en ambos grupos, el día 1 de cultivo.

CONCLUSIÓN

- La liberación del factor de crecimiento PDGF-BB desde el compuesto de quitosano-hidroxiapatita multilaminar fue constante, aunque la cantidad liberada fue mucho menor a lo que se esperaba (10% de la cantidad colocada inicialmente en el compuesto), ésta produjo su efecto aumentando la proliferación y diferenciación celular.
- Se observó un aumento en la proliferación osteoblástica bajo el efecto del factor de crecimiento PDGF-BB, mediante el uso de un método efectivo que midió la viabilidad y cantidad de osteoblastos dentro del compuesto, demostrándose el efecto estimulador del factor de crecimiento incorporado al compuesto.
- Claramente hubo un mayor depósito de calcio en los compósitos con factor de crecimiento, siendo una prueba indicativa de diferenciación celular. No se observó una diferencia significativa en la actividad de fosfatasa alcalina, debido posiblemente a las cantidades muy pequeñas de esta enzima en las muestras.
- Se puede concluir que este compuesto de quitosano-hidroxiapatita multilaminar enriquecido con el factor de crecimiento PDGF-BB y sembrado de células osteoblásticas, podría ser usado como implante para estimular la regeneración ósea.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Agarwala, S.; Bhagwat, A. 2005** Hydroxyapatite as a bone graft substitute: Use in cortical and cancellous bone. *Indian J Orthop* 39:254-256.
2. **Aijun, Z.; Dongchun, L.; Pei, S.; Rui, Z.; Ronglan, Z.; Baoli, W.; Gang, G.; Jingyu, Z. 2008** BMP-2 modified Hydroxyapatite/Chitosan Composite Scaffold for Bone Engineering. *Tianjin Nature and Science Foundation* 888-892.
3. **Arpornmaeklong, P.; Suwatwirote, N.; Pripatnanont, P.; OungbhoSeol, K. 2007.** Growth and Differentiation of Mouse Osteoblasts on Chitosan-Collagen Sponges. *Journal Oral Maxillofacial Surgery* 36: 328-337.
4. **Bandyopadhyay-Ghosh, S. 2008.** Bone as a Collagen-Hydroxyapatite Composite and its Repair. *Trends Biomater. Artif. Organs* 22(2): 112-120.
5. **Betsholtz, C. 2003** Biology of Platelet-Derived Growth Factors in Development. *Birth Defects Research (Part C)* 69:272–285.
6. **Chen, R.; Mooney, D. 2003.** Polymeric Growth Factor Delivery Strategies for Tissue Engineering. *Pharmaceutical Research* 20: 1103-1112.
7. **Fernández, M.; Arias, J.; Martinez, M.; Saenz, L.; Neira-Carrillo, A.; Arias, J. 20011.** Evaluation of a multilayered chitosan-hydroxyapatite porous composite enriched with fibronectin or an in vitro generated bone-like extracellular matrix on proliferation and differentiation of osteoblasts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
8. **Fernández-Tresguerres, I.; Alobera, M.; Pingarrón, M.; Blanco, L. 2006a** Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y Fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11:E471-51.
9. **Fernández-Tresguerres, I.; Alobera, M.; Pingarrón, M.; Blanco, L. 2006b** Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11:E151-7.
10. **Ge, Z.; Baguenard, S.; Khor, E.; Lim, L.; Wee, A. 2004.** Hydroxyapatite-Chitin Materials as Potential Tissue Engineered Bone Substitutes. *Biomaterials* 25: 1049-1058.

11. **Geetha, M.; Singh A.K.; Asokamani, R.; Gogia A.K. 2009.** Ti Based Biomaterials, the Ultimate Choice for Orthopaedic Implants – A review. *Progress in Materials Science* 54: 397–425.
12. **Hoch, R.; Soriano, P. 2003** Review: Roles of PDGF in Animal Development. *Development* 130 (20): 4769-4784.
13. **Jensen, D.; Li Z.; Pavel, I.; Dervishi, E.; Biris, A.; Jensen, P.; Lupu, D. 2007** Bone Tissue: A Relationship Between Micro and Nano Structural Composition and its Corresponding Electrostatic Properties with Applications in Tissue Engineering 55-59.
14. **Kieswetter, K.; Schwartz, Z.; Dean, D. D.; Boyan B. D. 1996.** The Role of Implant Surface Characteristics in the Healing of Bone. *Crit Rev Oral Biol Med.* 7(4):329-345.
15. **Kim, I.; Cho, C.; Kim., B.; Moon, H.; Park, I.; Seo, S.; Yoo, M.; Lee, Y. 2008.** Chitosan and its Derivatives for Tissue Engineering Applications. *Biotechnology Advances* 26: 1-21.
16. **Lee, Y.; Chung, C.; Klokkevold, P.; Han, S.; Ku, Y.; Lee, S.; Park, Y. 2000a.** The Bone Regenerative Effect of Platelet-Derived Growth Factor-BB Delivered With a Chitosan/Tricalcium Phosphate Sponge Carrier. *Journal Periodontal* 71: 418-424.
17. **Lee, Y.; Chung, C.; Klokkevold, P.; Choi, S.; Han, S.; Ku, Y.; Lee, S.; Park, Y. 2000b.** Tissue Engineered Bone Formation Using Chitosan/Tricalcium Phosphate Sponges. *Journal Periodontal* 71: 410-417.
18. **Lee, J.; Chung, C.; Im, S.; Lee, S.; Lee, Y.; Nam, S.; Park, Y.; Seol, Y. 2002.** Enhanced Bone Formation by Controlled Growth Factor Delivery from Chitosan-Based Biomaterials. *Journal of Controlled Release* 78: 187-197.
19. **Leeson, T.; Leeson, R.; Paparo, A. 1990.** *Texto/Atlas de Histología. Capítulo 4: Tejido Conectivo Especializado: Cartílago y Hueso* 167-188.
20. **McCarrel, T.; Fortie, L. 2009.** Temporal Growth Factor Release from Platelet-Rich Plasma, Trehalose Lyophilized Platelets, and Bone Marrow Aspirate and Their Effect on Tendon and Ligament Gene Expression. *Journal of Orthopaedic Research.* 27: 1033-1042.
21. **Morales-Álvarez, L.; Ariza, M. 2005.** Eventos de Señalización Asociados al Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). *Universitas Scientiarum* 10: 5-20.

- 22. Oliveira, J.; Azevedo, J.; Dias, I.; Gomes, M.; Malafaya, P.; Mano, J.; Reis, R.; Rodrigues, M.; Viegas, C. 2006.** Novel Hydroxyapatite/Chitosan Bilayered Scaffold for Osteochondral Tissue-Engineering Applications: Scaffold Design and its Performance when Seeded with Goat Bone Marrow Stromal Cells. *Biomaterials* 27: 6123-6137.
- 23. Seol, Y.; Chung, C.; Han, S.; Ku, Y.; Lee, J.; Lee, S.; Lee, Y.; Park, Y.; Rhyu, I. 2004.** Chitosan Sponges as Tissue Engineering Scaffolds for Bone Formation. *J Biotechnology Letters* 26: 1037-1041.
- 24. Southwood, L.; Frisbie, D.; Kawcak, C.; Mcilwraith, W. 2004.** Delivery of Growth Factors Using Gene Therapy to Enhance Bone Healing. *Veterinary Surgery* 33: 565-578.
- 25. Wang, M. 2006.** Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2 (2): 80-84.
- 26. Xu, H.; Simon, C. 2005.** Fast Setting Calcium Phosphate-Chitosan Scaffold: Mechanical Properties and Biocompatibility. *Biomaterials* 26: 1337-1348.

