



1 de septiembre de 2015 | Vol. 16 | Núm. 9 | ISSN 1607 - 6079

ARTÍCULO

INGENIERÍA DE TEJIDOS Y BIOCOMPATIBILIDAD: NANOMATERIALES BIOMIMÉTICOS, AGUA, MINERALIZACIÓN Y RESPUESTA CELULAR

<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num9/art74/>

Rodolfo Jesus Gonzalez Paz (Laboratorio Nacional de Nanotecnología en Costa Rica y es Vicepresidente de una NGO en el Amazonas)

Jose Roberto Vega Baudrit (Universidad de Alicante)

Kiara Zulima Riccardi Hernández (Universidad Politécnica de Cataluña)

INGENIERÍA DE TEJIDOS Y BIOCOMPATIBILIDAD: NANOMATERIALES BIOMIMÉTICOS, AGUA, MINERALIZACIÓN Y RESPUESTA CELULAR

Resumen

La ingeniería de tejidos se ha convertido, por un lado, en un importante campo de investigación y ha sido una herramienta determinante para la medicina regenerativa actual. Por otro lado, el estudio de biomateriales con aplicaciones médicas se concentra cada vez más en imitar la naturaleza y en generar soluciones que se acerquen más a la biología del cuerpo humano. Paralelamente, hoy en día existe una mayor conciencia por generar materiales que sean más sostenibles y cuya fabricación sea más amigable con el medio ambiente. El presente trabajo muestra diferentes estrategias investigadas por el autor para conseguir materiales que sean biocompatibles y que puedan emplearse a futuro en ingeniería de tejidos, específicamente con vías a aplicaciones en hueso, teniendo en cuenta la sustentabilidad para su obtención.

Palabras clave: biomiméticos, poliuretanos, ácidos grasos, citocompatibilidad, colágeno.

TISSUE ENGINEERING AND BIOCOMPATIBILITY: BIOMIMETIC NANOMATERIALS, WATER, MINERALIZATION AND CELLULAR RESPONSE

Abstract

On one hand, tissue engineering has become an important field of scientific research and it has been a prominent tool for the current regenerative medicine. On the other hand, the study of biomaterials for biomedical applications is strongly focused on mimicking of nature and on generation of solutions that more closely resembles the human body biology. In addition, nowadays there is greater awareness to generate more sustainable materials and environmentally friendly. This work shows different strategies developed by the author in order to produce biocompatible materials that could be used in tissue engineering applications mainly bone regeneration, considering the sustainability for their obtaining.

Keywords: biomimetics, polyurethanes, fatty acids, cytocompatibility, collagen.

INGENIERÍA DE TEJIDOS Y BIOCOMPATIBILIDAD: NANOMATERIALES BIOMIMÉTICOS, AGUA, MINERALIZACIÓN Y RESPUESTA CELULAR

Introducción

Recientemente, el campo de los biomateriales se ha concentrado en el desarrollo de materiales que no sólo sean bionertes, si no que sean capaces de interactuar de manera específica con el entorno biológico donde se encuentren. Las investigaciones de biomateriales se han enfocado cada vez más en estudiar la relación específica entre las propiedades físico-químicas de los materiales y las proteínas, enzimas o moléculas biológicas; así como en observar las funciones celulares y determinar los parámetros fisiológicos requeridos (WEIYUAN, 2002). De allí que las nuevas tecnologías y estrategias se orienten hacia un nuevo campo de biomateriales biomiméticos.

El término *biomimético* fue acuñado en 1957 por el Doctor Otto Schmitt, quien en su tesis doctoral desarrolló un dispositivo físico que imitaba la acción eléctrica de un nervio (BRUSHAN BHARAT, 2012). El biomimetismo es una disciplina que busca imitar la biología o la naturaleza y, de esta manera, generar soluciones tecnológicas. En la ingeniería de tejidos, el biomimetismo es de gran importancia, especialmente en el diseño de biomateriales, ya que puede favorecer respuestas celulares concretas y con esto la formación de tejido nuevo a través de interacciones específicas, potenciando la efectividad del tratamiento desarrollado (SHIN *et al.*, 2003). Por ejemplo, uno de los enfoques más prometedores en el diseño de andamios para ingeniería de tejidos, consiste en imitar la composición y las propiedades estructurales-morfológicas o mecánicas de la matriz extracelular, con el fin de conducir una adecuada respuesta celular (SMITH *et al.*, 2011; SARTORI *et al.*, 2014).

Quitosano

El quitosano, también llamado chitosán (del griego χιτών "coraza"), es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). Esta sustancia, se descubrió en el año 1859. Se puede usar en agricultura como fungicida y en la industria vitivinícola para evitar el deterioro del vino.

Alginatos

El alginato es un polisacárido aniónico distribuido ampliamente en las paredes celulares de las algas marinas pardas. Estas sustancias corresponden a polímeros orgánicos derivados del ácido algínico.

Glicosaminoglicanos (GAGs)

Los 'glicosaminoglicanos' o glicosaminoglucuronanos (este último nombre es el aceptado actualmente por las reglas IUPAC), son unas estructuras glucídicas, que suponen la fracción glucídica constituyente de los proteoglicanos, un tipo de biomoléculas de función estructural presentes fundamentalmente en el tejido conectivo, epitelial y óseo, así como en el medio intercelular.

En la ingeniería de tejidos, el biomimetismo es de gran importancia, especialmente en el diseño de biomateriales, ya que puede favorecer respuestas celulares concretas y con esto la formación de tejido nuevo a través de interacciones específicas, potenciando la efectividad del tratamiento desarrollado (SHIN *et al.*, 2003). Por ejemplo, uno de los enfoques más prometedores en el diseño de andamios para ingeniería de tejidos, consiste en imitar la composición y las propiedades estructurales-morfológicas o mecánicas de la matriz extracelular, con el fin de conducir una adecuada respuesta celular (SMITH *et al.*, 2011; SARTORI *et al.*, 2014).

Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un biomaterial para desempeñar la función deseada de acuerdo con el tratamiento médico, sin provocar ningún efecto indeseable local o sistémico en el beneficiario de la terapia, pero al mismo tiempo generando la mejor respuesta celular o del tejido en esa situación específica. Asimismo, puede optimizar el desempeño clínico de dicha terapia (WILLIAMS *et al.*, 2008).

Existen diversos materiales utilizados en ingeniería de

tejidos, los cuales se pueden subdividir en materiales naturales y materiales sintéticos. Dentro de los naturales se incluyen, por ejemplo, el colágeno, los glicosaminoglicanos (GAGs), **quitosano** y **alginatos** (GOUGH *et al.*, 2002). Las ventajas de éstos es que poseen una baja toxicidad y una baja respuesta inflamatoria crónica. Sin embargo, dentro de sus desventajas se encuentran las pobres propiedades mecánicas, así como estructuras complejas, que pueden dificultar su manipulación. Es por ello que tienen la posibilidad de combinarse con otros materiales naturales o sintéticos, con el fin de mejorar las propiedades mecánicas manteniendo la biocompatibilidad.

Algunos ejemplos de materiales sintéticos empleados incluyen polímeros como poliácido láctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), poliuretanos (PUs), politetrafluoroetileno (PTFE), polietilentereftalato (PET), biocerámicas como **hidroxiapatita** (HA) y fosfato tricálcico, y los tradicionales metales para implantes permanentes, tales como: acero inoxidable, aleaciones cromo-cobalto (Co-Cr) y aleaciones de titanio (Ti) (HOLZAPFEL *et al.*, 2013).

Ingeniería de tejidos del hueso

En las últimas décadas, la ingeniería de tejidos ha emergido como un método alternativo para la regeneración de tejidos y la restauración de la función de órganos a través de la implantación de células o tejidos cultivados fuera del cuerpo o estimulando el crecimiento celular dentro de una matriz que ha sido implantada (VATS *et al.*, 2003).

En lo que al hueso se refiere, una insuficiencia clínica ósea está definida como una discontinuidad en la integridad del hueso como resultado de un trauma, malformación congénita o resección quirúrgica. Este tejido posee la capacidad intrínseca de remodelarse y regenerarse espontáneamente. Sin embargo, dicha capacidad no se extiende a defectos de un cierto tamaño crítico. En esos casos, el hueso no se regenerará por sí solo, por lo que existirá la necesidad de intervenir quirúrgicamente al paciente. La prioridad por regenerar esos defectos óseos de tamaño crítico ha inspirado por más de dos décadas la búsqueda de terapias basadas en ingeniería de tejidos que permitan obtener resultados exitosos desde el punto de vista clínico (SHRIVATS *et al.*, 2014), lo cual implica no sólo que se forme tejido nuevo sino que también se reestablezca la función del hueso.

El presente trabajo tiene como objetivo mostrar diferentes investigaciones realizadas en los últimos cuatro años, las cuales persiguen la síntesis y optimiza-

Nucleación directa de la fase inorgánica (HA)

La nucleación es la primera etapa de un cambio de fase, donde se generan pequeñas superficies de fase distinta a la existente (orgánica o inorgánica), llamadas núcleos. Estos núcleos crecen hasta alcanzar un tamaño crítico.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La Calorimetría de barrido diferencial (en inglés: *Differential Scanning Calorimetry* o DSC) es una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una referencia es medida como una función de la temperatura. La muestra y la referencia son mantenidas aproximadamente a la misma temperatura a través de un experimento.

Tropocolágeno

La hélice de colágeno es un tipo de estructura secundaria de las proteínas que solamente la presenta el colágeno, que está formado por unas unidades denominadas tropocolágeno, y son estas las que presentan la hélice colágena.

Endoterma

Es el proceso mediante el cual un grupo de seres vivos denominados homeotermos mantienen su temperatura corporal dentro de unos límites, independientemente de la temperatura ambiental.

ción de biomateriales con la finalidad de que sean empleados a futuro como sustitutos óseos. Distintas estrategias biomiméticas han sido estudiadas con la finalidad de mejorar, entre otras propiedades, la citocompatibilidad de los materiales en cuestión.

1. Crecimiento biomimético de HA en fibras de colágeno

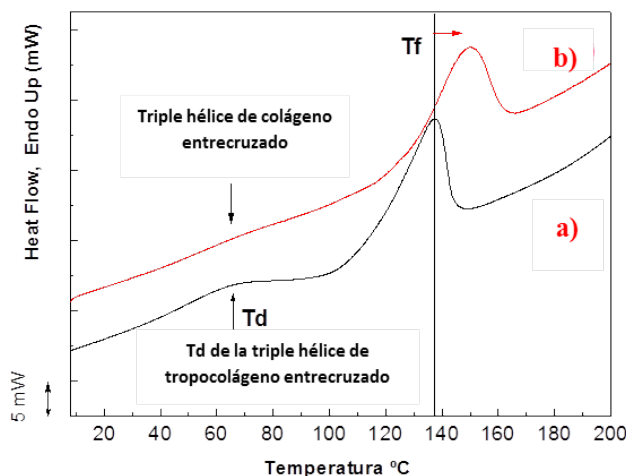
Se ha encontrado que algunos materiales biológicos, como el colágeno, exhiben una orientación uniaxial polar de dipolos moleculares en su estructura y pueden ser considerados como bioeléctricos. Esta característica permite la obtención de nanoestructuras altamente alineadas bajo condiciones biomiméticas. Basándose en dicha cualidad, en un estudio de González-Paz *et al.* (2011) se logró obtener nanocristales de hidroxiapatita (HA) dentro de fibras de colágeno auto-ensambladas y entrecruzadas.

A partir de tendones de colas de rata se obtuvo colágeno tipo I usando ácido fosfórico H_3PO_4 . La **nucleación directa de la fase inorgánica** (HA) dentro de las fibras de colágeno se realizó con una suspensión acuosa de hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$, hasta que se formara un hidrogel. Después de una semana de secado a 50 °C se obtuvo un polvo blanco, al cual, posteriormente, se le añadió una solución de genipina (0.5% m/V) como agente entrecruzante y se mantuvo por tres días más a 50 °C. La genipina es un compuesto de origen natural que se extrae de las flores de gardenia y forma productos estables al reaccionar con aminoácidos o proteínas.

La temperatura de secado empleada (50 °C) es inferior a la temperatura de desnaturalización (en adelante Td) de la triple hélice de **tropocolágeno** (Td = 63 °C), con lo cual se buscaba secar el hidrogel y promover el recocido del biopolímero mediante la organización de la HA dentro de las fibras de colágeno autoensambladas.

A través de **calorimetría diferencial de barrido** (DSC), se determinó que la Td del compuesto colágeno (35)/ HA (65) sin entrecruzar fue de 65 °C y la temperatura de fusión (en adelante Tf) Tf = 138 °C (ver Figura 1). Sin embargo, luego de entrecruzar el colágeno con la genipina, la **endoterma** de Td desapareció y la Tf incrementó a 155 °C, obteniendo así una Tf cercana a la de fibras de colágeno/HA de hueso cortical (Tf = 160 °C), también reportada por otros autores (TREBACZ *et al.*, 2005).

Figura 1. Termogramas obtenidos por DSC: a) fibras de colágeno/HA autoensambladas sin entrecruzar y b) fibras de colágeno/HA autoensambladas entrecruzadas con genipina.



Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS)

Es un procedimiento estándar para identificar y cuantificar la composición elemental de áreas de muestra hasta con tamaño tan pequeño como de algunos micrómetros cúbicos.

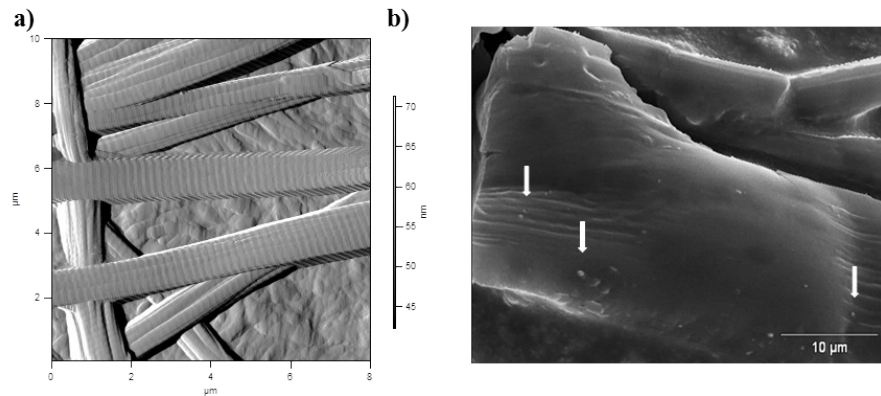
Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Es el estudio estructural que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen por reflexión. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra.

En la Figura 2 (a) se muestra una imagen de microscopía de fuerza atómica (AFM) de las fibras de colágeno biomimético, en la cual se observa un patrón similar al reportado por AFM para fibras de colágeno de hueso cortical (TREBACZ *et al.*, 2005). Los resultados de **microscopía electrónica de barrido (SEM)** sugirieron una efectiva nucleación de la HA dentro de las fibras de colágeno entrecruzadas. En la Figura 2 (b), las flechas blancas indican los puntos de nucleación en la microfibras de colágeno tal como ocurre en el hueso. Adicionalmente, a través de la técnica de microanálisis por **espectroscopia de energía dispersiva (EDS)** se encontró una relación de Ca/P = 1.65 en el compuesto entrecruzado, similar a la relación Ca/P reportada para el hueso de 1.67.

Gracias a este método se logró obtener un compuesto de colágeno/HA con características similares a las del hueso cortical. Sin embargo, se requieren estudios futuros para comprobar su posible aplicación como biomaterial en defectos del hueso.

Figura 2: a) Imagen de AFM de fibras de colágeno biomimético, b) Imagen de SEM de las fibras de colágeno biomimético.



2. Poliuretanos (PUs) a partir de ácidos grasos

Los poliuretanos (en adelante PUs) poseen numerosas aplicaciones en ingeniería de tejidos, particularmente, su uso en medicina ortopédica es bien conocido como sustitutos de hueso e injertos óseos (GONZÁLEZ-PAZ *et al.*, 2012). Por otro lado, actualmente existe una tendencia por el desarrollo de tecnologías más sostenibles y compatibles con el medioambiente. En el caso específico de los PUs, la estrategia consiste en reemplazar los monómeros convencionales obtenidos a partir de fuentes fósiles, como isocianatos y **polioles**, por materias primas obtenidas a partir de fuentes renovables.

Por esta razón, ha surgido un gran interés por los aceites vegetales, ácidos grasos y sus derivados para la producción de polioles e isocianatos para producir PUs. La elaboración de PUs a partir de ácidos grasos, tiene también como objetivo mejorar la biocompatibilidad, ya que se obtienen materiales a partir de moléculas más similares a las que abundan en el cuerpo humano.

Poliolios

Los poliolios son alcoholes polihídricos con varios grupos hidroxilo. La fórmula química general es $C_nH_{2n+2}O_n$. Un poliol es un carbohidrato que contiene más grupos hidroxilo que el azúcar al cual está asociado.

Diisocianato de difenilmetano (MDI)

El diisocianato de difenilmetano, comúnmente abreviado como MDI (de Metileno difenil 4,4'-diisocianato), es un diisocianato aromático. Existe en tres formas isoméricas diferentes, 2,2'-MDI, 2,4'-MDI y 4,4'-MDI, siendo este último sin embargo el más utilizado y calificado como "MDI puro" o MDI simplemente. El MDI se emplea abundantemente combinado con diferentes poliolios, glicoles, y/o diaminas en la producción de poliuretano.

Citocompatibilidad

Compatibilidad de propiedades de objetos de estudio de la biología celular o de la bioquímica celular.

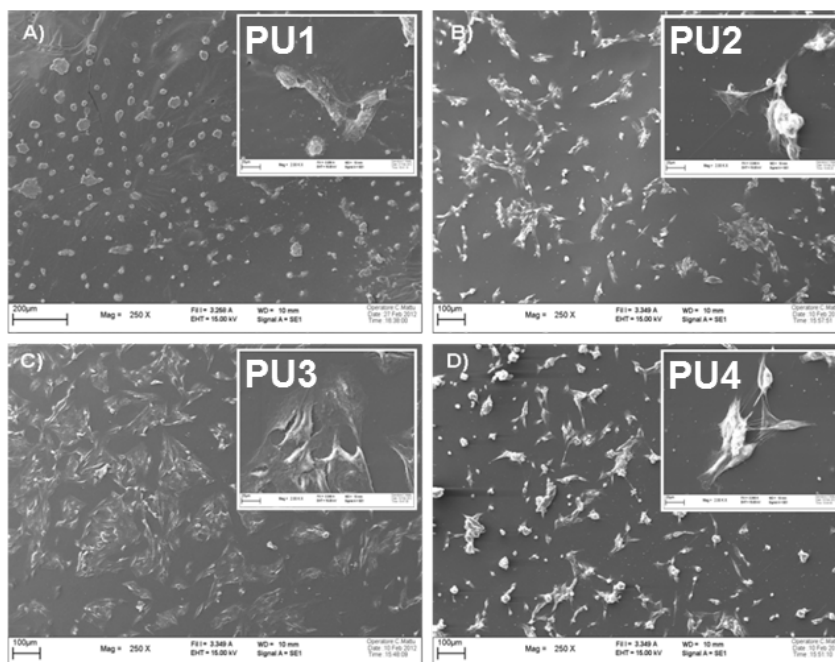
Con la finalidad de obtener dioles y poliolios renovables para la elaboración de PUs y que adicionalmente tengan un potencial uso en ingeniería de tejidos, se aplicó una reacción de acoplamiento tiol-ino a los ácidos grasos: 9-octadecinoico y 10-undecinoico. Éstos fueron obtenidos a partir de los ácidos grasos oleico (OL) y 10-undecenoico (UD), los cuales son los principales productos de saponificación del aceite de girasol alto oleico y pirólisis de aceite de ricino, respectivamente, con grupos funcionales hidroxilo. Los monómeros resultantes fueron polimerizados con **diisocianato de difenilmetano (MDI)**. A partir de los **dioles** obtenidos se sintetizaron PUs lineales termoplásticos, mientras que de los trioles se sintetizaron PUs termoestables.

Con el fin de evaluar la biocompatibilidad de los PUs, se realizaron estudios de citotoxicidad con una línea celular osteoblástica denominada MG63, durante un periodo de 24 horas a 37 °C. La viabilidad celular, basada en la actividad metabólica de las células, se midió empleando un ensayo conocido como MTS, el cual se aplica con frecuencia para detectar la citotoxicidad de polímeros por su fiabilidad y sensibilidad. La viabilidad celular medida con respecto a las condiciones del control establecido para el ensayo (únicamente placas de plástico para cultivo celular), en todos los casos fue superior al 75% y no hubo diferencias significativas entre los PUs lineales y los entrecruzados, ni entre los derivados de ácido oleico (OL) o ácido 10-undecenoico (UD).

A través de SEM se estudió la morfología de la superficie de los PUs (ver Figura 3). Después de las 24 horas se encontró que las células se adhirieron exitosamente sobre todas las muestras. En el caso del PU3 (Figura 3 (c)), las células se encontraron bien adheridas y extendidas sobre la superficie, mostrando una morfología plana y normal. Adicionalmente, éstas se encontraban conectadas entre sí a través de extensiones citoplasmáticas, a diferencia de las células sobre los otros PUs (PU1, PU2 y PU4), las cuales mostraron una morfología más redondeada.

Sin embargo, con base en los resultados obtenidos, se pudo concluir que todos los PUs estudiados podrían ser útiles como andamios en ingeniería de tejidos. Para mejorar la **citocompatibilidad** de los PUs ensayados, será necesario que posteriormente se lleven a cabo más estudios.

Figura 3. Micrografías obtenidas por SEM de las células MG63 cultivadas sobre los PUs: a) PU1: PU a partir de UD diol, b) PU2: PU a partir de OL diol, c) PU3: PU a partir de UD triol y d) PU4: PU a partir de OL triol.



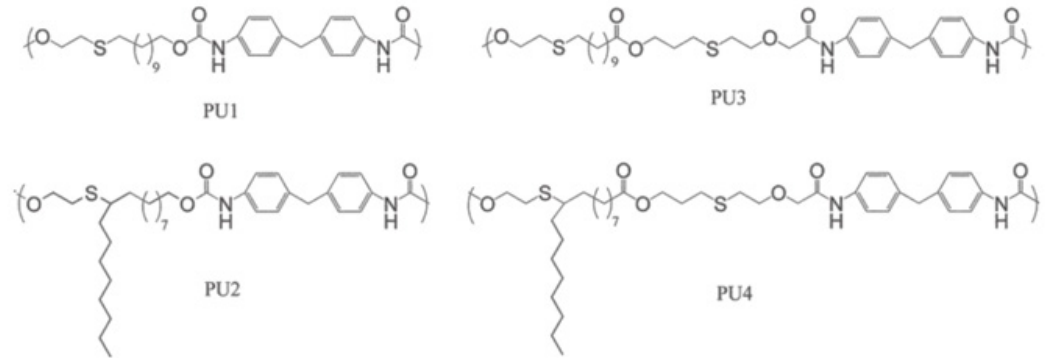
3. Bioactividad de poliuretanos en SBF

Se ha reportado ampliamente que uno de los requerimientos esenciales para que un material bioactivo se enlace con el hueso vivo, es la capacidad de dicho material para nuclear iones fosfato y calcio en la superficie y formar una capa de apatita similar a la del hueso (KATO *et al.*, 2000). La bioactividad de un material *in vivo* puede ser predicha empleando un ensayo *in vitro* con un fluido simulado del cuerpo, conocido por sus siglas en inglés como SBF (Simulated Body Fluid), cuya composición es similar al plasma sanguíneo humano. La preparación del SBF se realizó siguiendo las especificaciones de Kokubo *et al.*, 1990.

Cuando un material puede formar rápidamente fosfatos de calcio similares a los del hueso en su superficie al sumergirse en SBF, significa que podrá enlazarse al hueso vivo después de un corto periodo de haber sido implantado. Recientemente, la deposición biomimética de fosfato de calcio usando SBF ha demostrado ser un método eficaz para el revestimiento de muchos tipos diferentes de polímeros (GONZÁLEZ-PAZ *et al.*, 2013).

Se prepararon los PUs de acuerdo con el procedimiento descrito por González-Paz *et al.*, 2011. Las estructuras químicas de los mismos se presentan en la Figura 4.

Figura 4. Estructura química de los PUs.



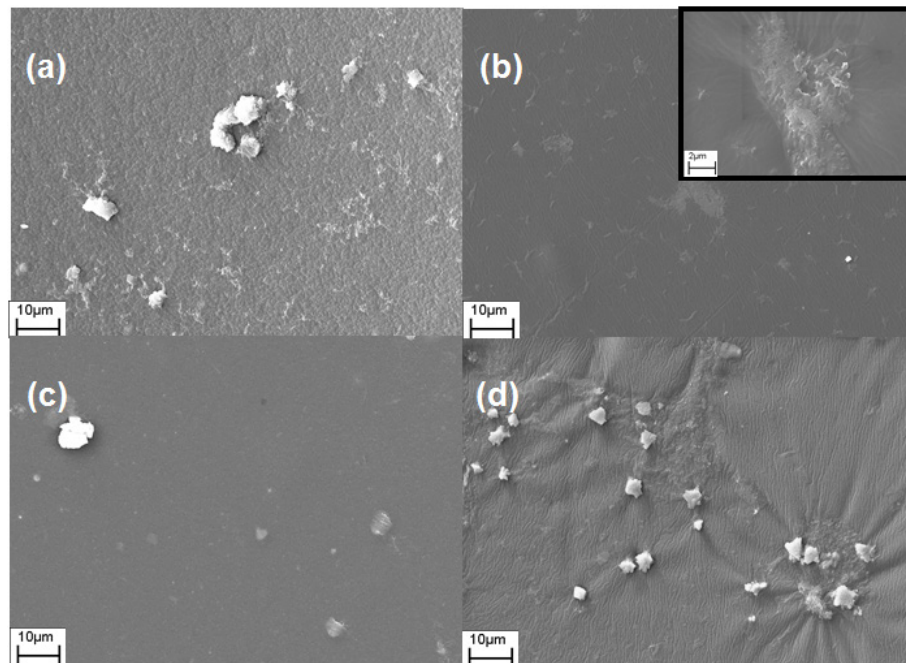
Los PUs mostrados en la Figura 4, fueron sometidos a un ensayo en SBF a 37 °C y evaluados a diferentes tiempos, una, dos, tres y cuatro semanas. Durante las primeras semanas de ensayo, no fue posible observar precipitación de fase mineral en la superficie de las muestras. En la Figura 5 pueden observarse las imágenes obtenidas por SEM de los PUs después de cuatro semanas en SBF. En éstas, se evidenció nucleación mineral en todas las composiciones y a través de la técnica de EDS, se analizó el contenido mineral en cada caso (ver Tabla 1).

Tabla 1. Análisis por EDS del contenido mineral de las distintas composiciones de PUs después de 4 semanas en SBF.

Muestra	Porcentaje atómico %			
	O	P	Ca	Ca/P
PU1	-	1.88	0.89	0.47
PU2	97.37	1.78	0.85	0.48
PU3	98	1.01	0.99	0.98
PU4	74.99	11.91	13.1	1.09

La relación calcio/fósforo (Ca/P) reportada para PU1 y PU2, fue cercana a 0.5, lo cual puede corresponder a un fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM) y para PU3 y PU4 la relación Ca/P fue cercana a 1, la cual puede corresponder a un fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) (GONZÁLEZ-PAZ *et al.*, 2013). El MCPM es utilizado en algunos cementos de fosfato de calcio en medicina y suplementos minerales en alimentos y bebidas. Por su parte, el DCPD es uno de los precursores de la hidroxiapatita y se emplea en cementos de fosfato de calcio para aplicaciones biomédicas y dentales.

Figura 5. Imágenes de SEM
 de los PUs después de 4
 semanas sumergidos en SBF:
 a) PU1, b) PU2, c) PU3 y
 d) PU4.



Si bien todos los PUs estudiados mostraron nucleación mineral en su superficie luego de cuatro semanas en SBF, sería conveniente mejorar la bioactividad de las muestras y que la nucleación ocurra en un menor tiempo. Esto último podría ser favorable tanto en una aplicación futura *in vivo* de los PUs, lo cual aseguraría una unión más rápida con el hueso vivo, como si se desea realizar el método de inmersión en SBF como un tratamiento para recubrir los PUs con fosfatos de calcio. Por esta razón, en un intento por mejorar las propiedades de los materiales en estudio, se realizaron mezclas de los PUs con distintas concentraciones de gelatina, y se consiguió, entre otras, cosas mejorar notablemente la bioactividad de los mismos y reducir los tiempos de nucleación mineral a una semana de tratamiento.

4. Inmovilización de condroitín sulfato en poliuretanos

Una de las estrategias para mejorar la citocompatibilidad de los materiales, es a través de su modificación superficial, con el fin de mejorar la interacción entre el material y las células vivas (GONZÁLEZ-PAZ *et al.*, 2012).

Las modificaciones superficiales se pueden clasificar en dos grandes categorías (GARCÍA, 2011):

- a) Físico-químicas: implican alteraciones de los átomos, compuestos o moléculas de la superficie (modificaciones químicas: oxidación, reducción, silanización, acetilación; modificaciones topográficas: pulido, granallado, entre otros).

b) Recubrimientos superficiales: consisten en la alteración superficial con injertos, recubrimientos covalentes y no covalentes, y deposición de películas.

Dentro de los recubrimientos superficiales, se encuentra la inmovilización de biomoléculas, por ejemplo: enzimas, anticuerpos, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos (GARCÍA, 2011).

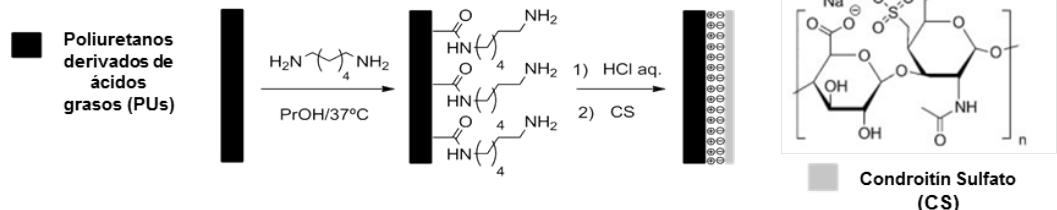
La modificación superficial de PUs a través del anclaje de moléculas bioactivas, permite no sólo mejorar los problemas de compatibilidad de la superficie, sino que también evita alterar las propiedades de resto del material, conservando sus características, por ejemplo, las mecánicas.

Con el objeto de mejorar la citocompatibilidad de los PUs derivados de ácidos grasos obtenidos en el trabajo citado anteriormente, se inmovilizó condroitín sulfato (CS) en la superficie de películas de PUs (GONZÁLEZ-PAZ *et al.*, 2012). La razón por la cual se seleccionó el CS, un glucosaminoglucano sulfatado, se debe a que éste es uno de los mayores componentes de la matriz extracelular del cartílago y los huesos. Además, juega un papel importante en la regulación de la expresión del fenotipo de los **condrocitos**, en la **diferenciación osteogénica** (SCHNEIDERS *et al.*, 2012) y, adicionalmente, se encuentra involucrado en la señalización intracelular, reconocimiento celular y conexión de los componentes de la matriz extracelular con las **glicoproteínas** de la superficie celular (GONZÁLEZ-PAZ *et al.*, 2012).

En la Figura 6 se puede observar el esquema de la modificación realizada, la cual consistió en la aminólisis de los grupos éster de la superficie de los PUs y la inmovilización iónica del CS.

<p>Condrocitos</p> <p>Los condrocitos (del griego chondros cartílago + kytos célula) son un tipo de célula que se encuentran en el cartílago.</p>
<p>Condroitín Sulfato</p> <p>El condroitín sulfato o sulfato de condroitina (del griego χόνδρος "cartílago") es un glucosaminoglucano sulfatado compuesto por una cadena de disacáridos de N-acetilgalactosamina y N-ácido glucurónico alternados. El condroitín sulfato se encuentra habitualmente asociado a proteínas constituyendo agregados de alto peso molecular denominados proteoglicanos.</p>
<p>Diferenciación osteogénica</p> <p>Diferenciación de las propiedades óseas características desde sus orígenes humanos o animales.</p>
<p>Glicoproteínas</p> <p>Las glicoproteínas o glucoproteínas son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Destacan entre otras funciones la estructural y el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas (glucocálix).</p>

Figura 6. Esquema de modificación de PUs para inmovilizar CS.



Los PUs evaluados son el PU1 (obtenido a partir de UD diol), PU2 (obtenido a partir de OL diol (ver en la Figura 7 la estructura química) y sus versiones modificadas con **condroitín sulfato**, respectivamente PU1-CS y PU2-CS.

Figura 7. Estructura química de los PUs evaluados.

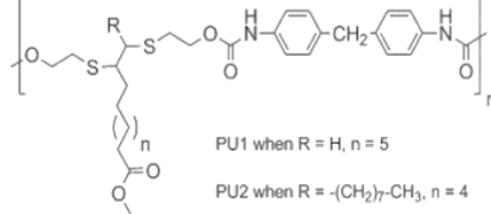
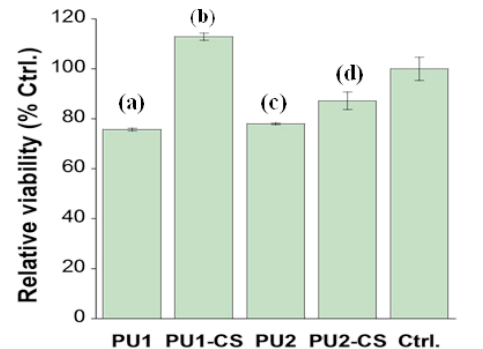


Figura 8. Resultados de citotoxicidad por MTS para los diferentes PUs y muestra control.

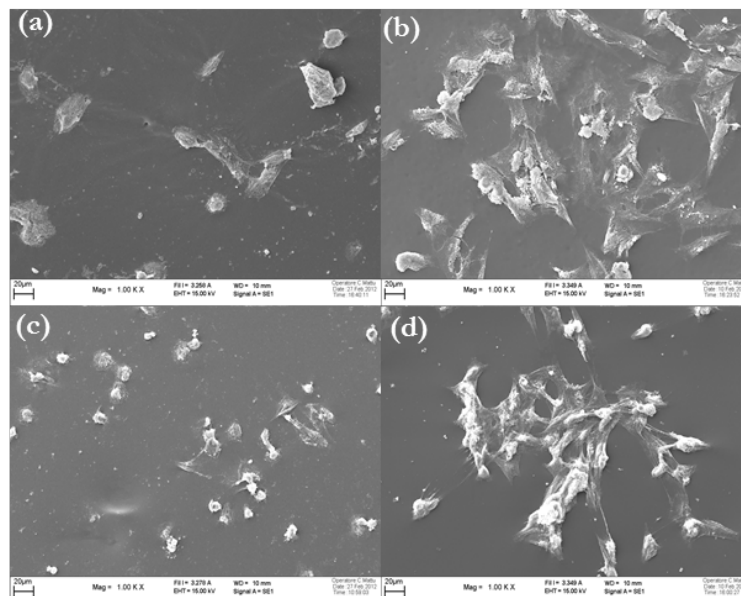


La citocompatibilidad de los PUs fue evaluada nuevamente a través de cultivos celulares con MG63, y el ensayo de MTS mostró que la incorporación del CS en la superficie de los PUs mejoró la viabilidad celular (ver Figura 8). En el caso del PU1, la viabilidad celular aumentó en un 36% después de la inmovilización de CS, mientras que en el caso del PU2-CS el incremento fue de un 10% en comparación con el PU2.

Estos resultados comprobaron que la presencia de CS en la superficie de los PUs promueve la adhesión celular y mejora la unión celular de los osteoblastos a través de la interacción ligando-receptor. Por otra parte, otra posible explicación es que la presencia del CS hidrofílico favorece la penetración del medio de cultivo en la superficie del material, y de esta manera se mejora la adhesión de las células y su posterior crecimiento.

Al cabo de 24 horas de cultivo celular, se observó gracias a las imágenes obtenidas por SEM (ver Figura 9) que las células se adhieren a la superficie de todos los PUs. Sin embargo, en el caso de las muestras no modificadas con el CS (PU1 y PU2), la morfología de las células evidencia que éstas no se dividieron ni se encuentran extendidas, sino que, por el contrario, se observan aglomeradas. Las células en las muestras PU1-CS y PU2-CS se encontraban bien adheridas, evidencian una morfología extendida y una configuración plana.

Figura 9. Imágenes de SEM obtenidas para la superficie de los PUs luego de 24 horas de cultivo con células MG63: a) PU1, b) PU1-CS, c) PU2 y d) PU2-CS.



La conclusión del presente estudio fue que la inmovilización del CS mejoraba tanto la hidrofiliidad como la citocompatibilidad de la superficie de los PUs, con lo que este método de modificación es adecuado para favorecer la actividad biológica de los poliuretanos derivados de ácidos grasos (GONZÁLEZ-PAZ *et al.*, 2012).

Conclusiones

En los estudios citados en el presente trabajo se consiguió obtener exitosamente, y a través de una ruta novedosa, PUs fabricados a partir de dioles y trioles provenientes de ácidos grasos. Éstos, además de ser más sostenibles, exhiben propiedades adecuadas para que sean considerados candidatos a una aplicación en ingeniería de tejidos. Los resultados aquí mostrados se orientaron únicamente a la parte de citocompatibilidad y bioactividad de los materiales. Sin embargo, resultados adicionales relacionados con propiedades químicas, térmicas y mecánicas de los mismos, pueden ser consultados en las respectivas publicaciones.

Otra de las ventajas que presentaron los PUs en cuestión, es su versatilidad para ser combinados con otras moléculas o compuestos, con el fin de mejorar notablemente su citocompatibilidad. Tal es el caso del estudio con CS.

Por otro lado, a través de un método innovador se logró obtener nanocristales de hidroxiapatita (HA) dentro de fibras de colágeno auto-ensambladas y entrecruzadas con genipina. Dicho compuesto resultó tener características similares a las del hueso cortical, por lo que representa una opción como biomaterial para regenerar en defectos del hueso.

Dioles

Compuesto químicos que contiene dos grupos hidroxilo (grupos -OH).

Hidroxiapatita

El mineral apatito-(CaOH), también llamado hidroxiapatita o hidroxiapatito, está formado por fosfato de calcio cristalino ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$); a veces formulado como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para denotar que la unidad cristalina está formada por dos entidades. Representa un depósito del 99% del calcio corporal y 80% del fósforo total.

Bibliografía

- [1] BRUSHAN BHARAT, *Biomimetics: Bioinspired Hierarchical-Structured Surfaces for Green Science and Technology*, Springer, 2012, p. 1.
- [2] GARCÍA, A., "Surface Modification of Biomaterials", *Principles of Regenerative Medicine*, 2011, 1, pp.663-673.
- [3] GONZÁLEZ-PAZ, R. J. *et al.*, "Biomimetic Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals Inside Self-Assembled Collagen Fibers", *Tissue Engineering Part A*, 2011, 17(17-18), pp. A-1-A-25 (P-14).
- [4] GONZÁLEZ-PAZ, R. J. *et al.*, "A Green Approach Toward Oleic- and Undecylenic", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2011, Núm. 49, pp. 2407-2416.
- [5] GONZÁLEZ-PAZ, R. J. *et al.*, "Enhancement of Fatty Acid-based Polyurethanes Cytocompatibility by Non-covalent Anchoring of Chondroitin Sulfate", *Macromolecular Bioscience*, 2012, Núm. 12, pp.1697–1705.
- [6] GONZÁLEZ-PAZ, R. J. *et al.*, "Thiol–yne reaction of alkyne-derivatized fatty acids: biobased polyols and cytocompatibility of derived polyurethanes", *Polymer Chemistry*, 2012, Núm. 3, pp. 2471-2478.
- [7] GONZÁLEZ-PAZ, R. J. *et al.*, "Study on the interaction between gelatin and polyurethanes derived from fatty acids", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2013, 101A, pp. 1036-1046.
- [8] GOUGH, J. E., *et al.*, "Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly (vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis", *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, Núm. 61, pp. 121-130.
- [9] HOLZAPFEL, B. M., *et al.*, "How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, Núm. 65, pp. 581–603.
- [10] KATO, H. *et al.*, "Bonding of alkali- and heat-treated tantalum implants to bone", *Journal of biomedical materials research*, 2000, Núm. 53, pp.28-35.
- [11] KOKUBO, T. *et al.*, "Bioactivity of CaO.SiO₂-based glasses: In vitro evaluation", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1990, Núm. 1, pp. 239–244.
- [12] SARTORI, S. *et al.*, "Biomimetic polyurethanes in nano and regenerative medicine", *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, Núm. 2, 5128-5144.
- [13] SCHNEIDERS, W. *et al.*, "Effect of chondroitin sulfate on osteogenetic differentiation

- of human mesenchymal stem cells", *Materials Science and Engineering C*, 2012, Núm. 32, pp.1926-1930.
- [14] SHIN, H. *et al.*, "Biomimetic materials for tissue engineering", *Biomaterials*, 2003, Núm. 24, pp.4353-4364.
- [15] SHRIVATS, A. R. *et al.*, "Bone tissue engineering: state of the union", *Drug Discovery Today*, 2014, Núm. 19, pp. 781-786.
- [16] SMITH, I. O. y MA, P. X., "Biomimetic Scaffolds in Tissue Engineering". En: PALLUA, N. (ed.), *Tissue Engineering: From Lab to Clinic*, Berlín: Springer, 2011, pp. 31-40. ISBN: 978-3-642-02823-6.
- [17] TREBACZ, K. *et al.*, "Thermal Stabilization of Collagen Molecules in Bone Tissue", *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, Núm. 37, pp. 257-262.
- [18] VATS, A. *et al.*, "Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications", *Clinical Otolaryngology*, 2003, Núm. 28, pp. 165-172.
- [19] WEIYUAN, J.K., "Biomimetics", *Polymeric Biomaterials Revised and Expanded*, 2002, pp. 63-78.
- [20] WILLIAMS, D.F., "On the Mechanisms of Biocompatibility", *Biomaterials*, 2008, Núm. 29, pp. 2941–2953.