

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Desarrollo y evaluación *in vitro* de hidrogeles con actividad
antioxidante para su aplicación en la regeneración ósea**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Tonatzin Zertuche Arias

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Tonatzin Zertuche Arias

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

Miembros del comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Dr. Víctor Ruiz Cortes

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Tonatzin Zertuche Arias © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Tonatzin Zertuche Arias** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Desarrollo y evaluación *in vitro* de hidrogeles con actividad antioxidante para su aplicación en la regeneración ósea

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

Recientemente se ha establecido la relación entre el estrés oxidante y la densidad mineral ósea, durante la regeneración ósea provocada por un traumatismo o ciertas patologías óseas. La pérdida ósea se produce principalmente por las altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) y moléculas proinflamatorias, que aumentan el número de osteoclastos, y promueven la muerte de osteoblastos y osteocitos. El ácido α -lipoico (ALA), es un potente antioxidante que puede neutralizar las ROS y ha mostrado prometedoras respuestas como agente señalizador anti-osteoclastogénico y pro-osteoblastogénico, capaz de rescatar de apoptosis osteocitos y osteoblastos. En este trabajo sintetizamos hidrogeles implantables a base de gelatina e hidrogeles inyectables a base de alginato modificado con gelatina, y ALA. Los hidrogeles fueron caracterizados en términos de microestructura por microtomografía computarizada y absorción de PBS 1X, mostrando ser estructuras porosas con alta capacidad de absorción de PBS 1X. Ambos hidrogeles, implantables e inyectables con ácido α -lipoico, poseen actividad antioxidante en términos de la inhibición de la oxidación del radical ABTS en un $55.59 \pm 2.77\%$ y 100% , respectivamente; además de poseer actividad antiinflamatoria, en términos de remoción de óxido nítrico en un $19.02 \pm 1.77\%$ y $92.54 \pm 0.017\%$, respectivamente. La biocompatibilidad de los hidrogeles se determinó mediante hemocompatibilidad y citocompatibilidad. Los hidrogeles demostraron ser altamente hemocompatibles al tener menos de 5% de hemólisis. La viabilidad celular se evaluó con MTT y el kit Live/Dead®, en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, demostraron que las formulaciones son citocompatibles en células óseas, lo que establece su potencial para ser utilizados en la regeneración ósea.

Palabras clave: Hidrogeles, regeneración ósea, biomateriales, antioxidantes, osteoblastos

Abstract of the thesis presented by **Tonatzin Zertuche Arias** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Development and *in vitro* evaluation of hydrogels with antioxidant activity for their application in bone regeneration

Abstract approved by:

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Codirectora de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

The relationship between oxidative stress and bone mineral density has recently been established during bone regeneration caused by trauma or bone pathologies. Bone loss occurs mainly due to high concentrations of reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory molecules, which increase the number of osteoclasts, and promote the death of osteoblasts and osteocytes. α -lipoic acid (ALA) is a potent antioxidant that is a strong scavenger of free radicals like ROS and has shown promising responses as an anti-osteoclastogenic and pro-osteoblastogenic signaling agent, capable of rescuing osteocytes and osteoblasts from apoptosis. In this work we synthesized implantable hydrogels based on gelatin and injectable hydrogels based on gelatin modified alginate, and ALA. The hydrogels were characterized in terms of their microstructure by computed microtomography and absorption of PBS 1X, showing porous structures with high absorption capacity of 1X PBS. Both hydrogels, implantable and injectable with ALA, possess antioxidant activity in terms of inhibiting the oxidation of the radical ABTS^{•+} of $55.59 \pm 2.77\%$ and 100% , respectively; in addition, they had anti-inflammatory activity, in terms of nitric oxide scavenging of $19.02 \pm 1.77\%$ and $92.54 \pm 0.017\%$, respectively. The biocompatibility of the hydrogels was determined by hemocompatibility and cytocompatibility. The hydrogels proved to be highly hemocompatible, having less than 5% hemolysis. Cell viability was evaluated with MTT and Live/Dead[®] kit, in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells, we demonstrated that the formulations of both hydrogels are cytocompatible in bone cells, which establishes their potential to be used in bone regeneration.

Keywords: Hydrogels, bone regeneration, biomaterials, antioxidants, osteoblasts

Dedicatoria

*“All that is gold does not glitter,
Not all those who wander are lost;
The old that is strong does not wither,
Deep roots are not reached by the frost.*

*From the ashes a fire shall be woken,
A light from the shadows shall spring;
Renewed shall be blade that was broken,
The crownless again shall be king.”*

-J.R.R Tolkien

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por permitirme llevar a cabo mis estudios de maestría y realizar el presente proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con la cual pude concluir exitosamente la maestría.

A la Dirección de Estudios de Posgrado, en especial a la M. en C. Dolores Sarracino por darme la oportunidad de inscribirme al posgrado. Al posgrado en Ciencias de la Vida por haberme brindado el espacio y las herramientas para desenvolverme académicamente.

A mis tutoras, a la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña y la Dra. Patricia Juárez Camacho, por aceptarme como su alumna. En todo momento estuvieron apoyándome, guiándome en cada experimento, siempre motivándome en cada resultado.

A los miembros del comité de este proyecto, la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, el Dr. Víctor Ruiz Cortés y la Dra. Ana G. Rodríguez Hernández, por su disposición al aceptar estar en este proyecto, por sus aportaciones que hicieron salir adelante este proyecto.

Al Dr. José Enrique Íñiguez Pacheco, del Departamento de Geología y CeMIEGeo, por su atención y las reconstrucciones tridimensionales por microtomografía computarizada.

A Alonso Cordero Humberto Fabián, técnico del Departamento de Óptica de la División de Física Aplicada, por su tiempo y apoyo en la obtención de imágenes por microscopía electrónica de barrido.

A mi familia, por el apoyo incondicional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Tejido óseo.....	2
1.1.2 Remodelación ósea.....	4
1.1.3 Regeneración ósea.....	6
1.1.4 Especies reactivas de oxígeno.....	8
1.1.5 Antioxidantes en la regeneración ósea.....	9
1.1.6 Ácido α -lipoico.....	9
1.1.7 Tratamientos actuales para defectos óseos.....	12
1.1.8 Biomateriales para regeneración ósea.....	12
1.1.8.1 Uso de alginato en hidrogeles.....	13
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis	16
1.4 Objetivos.....	16
1.4.1 Objetivo general	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Síntesis de hidrogeles.....	17
2.1.1 Preparación de hidrogel implantable.....	17
2.1.2 Preparación de hidrogel inyectable.....	18
2.2 Caracterización de hidrogeles.....	19
2.2.1 Grado de entrecruzamiento.....	19
2.2.2 Absorción de PBS 1X.....	20
2.2.3 Microscopía electrónica de barrido y microtomografía computarizada.....	20

2.3 Evaluación <i>in vitro</i> de hidrogeles.....	21
2.3.1 Actividad antiinflamatoria.....	21
2.3.2 Actividad antioxidante.....	21
2.3.3 Hemocompatibilidad.....	22
2.3.4 Citocompatibilidad.....	22
2.4 Análisis estadístico de los datos.....	23
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Hidrogeles implantables e inyectables.....	24
3.2 Caracterización de hidrogeles	29
3.2.1 Análisis microscópico.....	29
3.2.2 Grado de entrecruzamiento.....	33
3.2.3 Absorción de PBS 1X.....	34
3.3 Evaluación <i>in vitro</i> de hidrogeles.....	36
3.3.1 Actividad antiinflamatoria.....	36
3.3.2 Actividad antioxidante.....	37
3.3.3 Hemocompatibilidad.....	39
3.3.4 Citocompatibilidad.....	40
Capítulo 4. Discusión.....	43
	48
Capítulo 5. Conclusiones.....	50
Literatura citada.....	

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura y composición ósea.	3
2	Poblaciones celulares óseas en el proceso de remodelación.....	4
3	Proceso de regeneración ósea	7
4	Mecanismo propuesto del papel del ALA en la regeneración ósea	11
5	Síntesis de hidrogel implantable a base de gelatina 0.75%.....	18
6	Síntesis de hidrogel inyectable a base de alginato dialdehído 5% con gelatina 10%.....	19
7	Viabilidad de células L929 cultivadas con proporciones de emulsificante con medio de cultivo	24
8	Viabilidad de células L929 cultivadas en hidrogeles implantables	25
9	Fotografía de los hidrogeles implantables.....	26
10	Oxidación del alginato de sodio con peryodato de sodio.....	27
11	Determinación de ausencia de peryodato de sodio.....	27
12	Formación del hidrogel inyectable.....	28
13	Obtención de hidrogeles inyectables	28
14	Fotografía de los hidrogeles inyectables.....	29
15	Caracterización estructural por microtomografía computarizada de hidrogeles implantables e inyectables	31
16	Caracterización morfológica por SEM de hidrogeles implantables.....	32
17	Grado de entrecruzamiento de hidrogeles inyectables.....	33
18	Capacidad de absorción de PBS 1X de hidrogeles implantables.....	34
19	Capacidad de absorción de PBS 1X de hidrogeles inyectables.....	35
20	Capacidad antiinflamatoria de hidrogeles implantables.....	36
21	Capacidad antiinflamatoria de hidrogeles inyectables.....	37
22	Capacidad antioxidante de hidrogeles implantables.....	38
23	Capacidad antioxidante de hidrogeles inyectables.....	38

24	Porcentaje de hemólisis de hidrogeles implantable.....	39
25	Porcentaje de hemólisis de hidrogeles inyectable.....	40
26	Viabilidad de células MC3T3-E1 cultivadas con hidrogeles implantables.....	41
27	Viabilidad de células MC3T3-E1 cultivadas en hidrogeles inyectables.....	42

Capítulo 1. Introducción

El hueso es un tejido dinámico que se construye, descompone y reconstruye constantemente en un proceso llamado remodelación ósea. Un equilibrio entre las actividades de los osteoblastos formadores de hueso y los osteoclastos reabsorbentes de hueso asegura que el hueso se forme y reabsorba a velocidades comparables (Raggatt y Partridge, 2010). Este equilibrio es clave para mantener huesos fuertes. Después de los 30 años, la mayoría de las personas experimentan una pérdida gradual de masa ósea debido a una disminución relativa de la actividad de los osteoblastos en comparación con los osteoclastos (Hutchings et al., 2020). El estrés oxidante está relacionado con un aumento de la renovación y reabsorción ósea local observada en enfermedades óseas y traumatismos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, lo que favorece la osteoclastogénesis e inhibe la mineralización y la osteogénesis. La apoptosis excesiva de los osteocitos se correlaciona con el estrés oxidativo que provoca un desequilibrio a favor de la osteoclastogénesis que conduce a un aumento del recambio de remodelado óseo y pérdida ósea (Domazetovic et al., 2017).

Convencionalmente, el tratamiento de la fractura ósea no consolidada implica cirugía para estabilizar el sitio de la fractura e injerto óseo para estimular el crecimiento de hueso y nuevos vasos sanguíneos. Para el tejido óseo, a pesar de su alta vascularización, las técnicas de reparación comúnmente utilizadas, como el autoinjerto y el aloinjerto, son limitadas debido a los riesgos de morbilidad en el sitio donante, infección potencial y una alta tasa de pseudoartrosis con los tejidos del huésped.

El ácido α -lipoico y el ácido dihidro-lipoico (DHLA) forman una pareja redox que es capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS), aumentar los niveles de vitaminas C y E, y de glutatión reducido (GSH) (Shay et al., 2008). Hasta la fecha, se han realizado 2 estudios clínicos en humanos que examinaron los efectos del ALA administrado por vía oral sobre la densidad mineral ósea. El primer estudio examinó los efectos de 600 mg de ALA dos veces al día durante 1 año sobre la densidad ósea en pacientes (n = 42) con enfermedad de Parkinson (S. H. Lee et al., 2010). El segundo estudio investigó los efectos de un cóctel de antioxidantes mixtos (incluidos 300 mg de ALA) más tabletas que contienen calcio y vitamina D3 tomadas dos veces al día durante 1 año por mujeres postmenopáusicas osteopénicas (Mainini et al., 2012). En el primer estudio se encontró un aumento significativo en la densidad mineral ósea del trocánter después de ajustar el índice de masa corporal; en el último estudio, se encontró un aumento significativo en la densidad mineral ósea del pie, medida por ultrasonometría cuantitativa del talón.

Los hidrogeles son redes poliméricas hidrófilas tridimensionales capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Debido a su alto contenido de agua, porosidad y consistencia blanda, simulan el tejido vivo natural, más que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos (Caló y Khutoryanskiy, 2015). Los hidrogeles, pueden servir como acarreadores de sustancias bioactivas, las cuales pueden cargarse en la matriz del hidrogel durante la síntesis de éste, para liberarse posteriormente por degradación del polímero o difusión a través de los poros de la estructura tridimensional, o por una combinación de ambos (Uhrich y Abdelhamid, 2016).

Sin embargo, todavía existen retos en el diseño de hidrogeles en la incorporación de sustancias bioactivas como el ALA, el cual posee una naturaleza lipofílica. La actividad osteogénica, antiinflamatoria y antioxidante del ALA ha sido bien establecida de manera *in vitro* e *in vivo*, por lo que en este trabajo se reporta la elaboración de hidrogeles a base de polímeros naturales, alginato y gelatina, cargados con ácido α -lipoico emulsificado con Kolliphor EL40®. Los hidrogeles obtenidos se evaluaron con respecto a sus características microestructurales, capacidad de absorción de PBS 1X, actividad antioxidante y antiinflamatoria y su biocompatibilidad.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Tejido óseo

El sistema óseo es una estructura dinámica altamente vascularizada constituida por huesos, los cuales se encargan de proveer el sostén de tejidos y protección a órganos internos, generar células hematopoyéticas, contribuir a la homeostasis del cuerpo, y almacenar minerales y triglicéridos (Tortora y Derrickson, 2018).

El tejido óseo se compone de una matriz extracelular (ECM) abundante compuesta de 20% agua, 30% fibras colágenas y no colágenas y 50% sales minerales (**Figura 1**). El 90% de las proteínas que conforman el hueso, son colágeno tipo I y tipo V, mientras que el 10% de proteínas no colágenas son proteoglicanos y glicoproteínas. Las sales minerales proporcionan la dureza al tejido óseo y se encuentran en mayor cantidad, un ejemplo es el fosfato de calcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ que se combina con el hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$

para formar cristales de hidroxipatita de calcio $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, a este proceso se le conoce como calcificación (Bonucci, 2012).

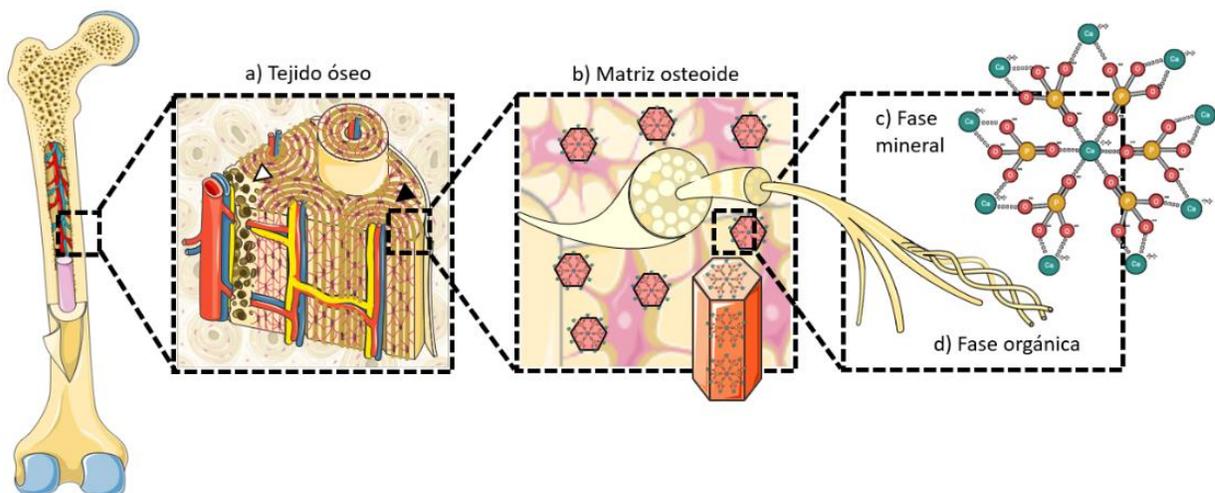


Figura 1. Estructura y composición del hueso. Diagrama de la composición del hueso en diferentes niveles. a) Tejido óseo. Tejido esponjoso (flecha blanca), tejido compacto (flecha negra). b) Matriz extracelular del hueso (osteoide). c) Fase mineral, cristal de hidroxipatita de calcio. d) Fase orgánica, fibras de colágeno.

Los huesos poseen espacios entre las células y los componentes de la matriz extracelular, funcionando como conductos para que los vasos sanguíneos provean de nutrientes a las células óseas, y como depósito de la médula ósea roja. Dependiendo del tamaño y distribución de los espacios, las zonas del hueso se pueden clasificar como tejido compacto, que constituye el 80% del volumen del esqueleto adulto, y se dispone en forma de láminas lo que le confiere rigidez; y el tejido esponjoso que constituye el 20% y está formado por una red de trabéculas (**Figura 1**) (Fuchs et al., 2009).

Las principales poblaciones celulares óseas son los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos (**Figura 2**). Las células progenitoras mesenquimales derivadas de médula ósea poseen la capacidad de auto renovarse y dar origen a un linaje osteoblástico. Los osteoblastos se encargan de sintetizar las proteínas de la ECM e inician el proceso de calcificación sobre las fibras de colágeno. Cuando las células quedan completamente rodeadas por ECM, reciben el nombre de osteocitos. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso, 10 veces más que los osteoblastos, se conectan entre sí en las lagunas de las osteonas del hueso compacto para proveer de oxígeno y nutrientes al tejido óseo. Los osteoclastos son células grandes multinucleadas derivadas de un linaje mieloide, formadas por la fusión de 50 monocitos que degradan la matriz osteoide por medio de enzimas lisosómicas para permitir el desarrollo,

crecimiento, mantenimiento y reparación normales del hueso (Fuchs et al., 2009; Tortora y Derrickson, 2017).

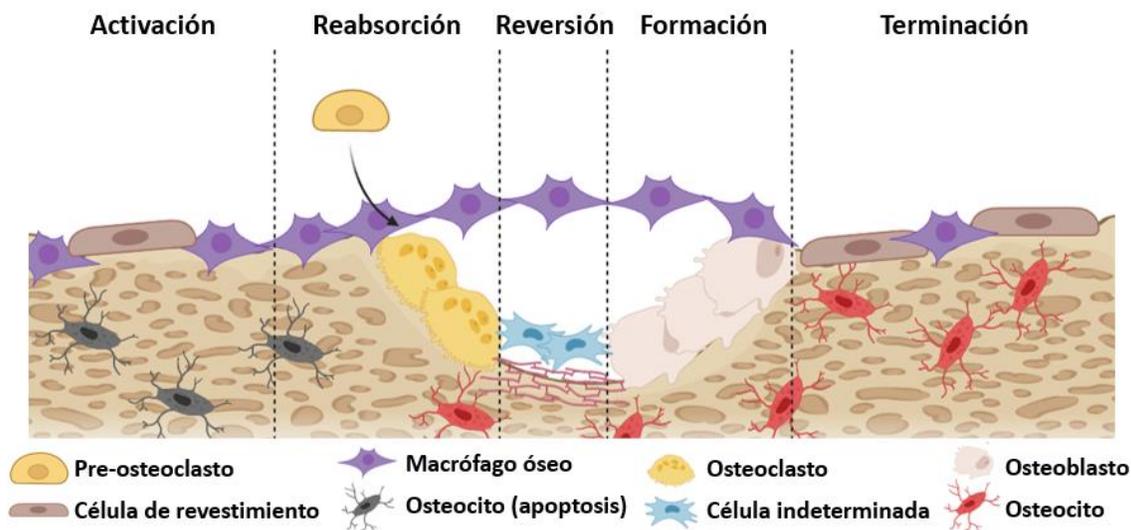


Figura 2. Poblaciones celulares óseas en el proceso de remodelación. Esquema de las fases de remodelación ósea y la distribución de principales poblaciones celulares que conforman el hueso, y que participan a lo largo del proceso de remodelación.

1.1.2 Remodelación ósea

La remodelación ósea es un proceso altamente coordinado que implica la reabsorción y formación de ECM por parte de los osteoclastos y los osteoblastos, respectivamente, con la finalidad de regular la homeostasis de calcio, reparar el microdaño a los huesos, y moldear los huesos durante el crecimiento (**Figura 2**).

El remodelamiento del hueso ocurre durante varias semanas y mediante la formación de clústers de osteoclastos y osteoblastos, arregladas en estructuras anatómicas temporales llamadas “Unidades Multicelulares Básicas” (BMUs). Este proceso se lleva a cabo en fases secuenciales de activación, reabsorción, inversión, formación y terminación (Raggatt y Partridge, 2010).

La fase de activación inicia con una señal, que puede ser un estímulo mecánico que resulte en daño estructural, o puede ser una hormona (hormona calciotrópica o estrógeno) que causará un cambio en la homeostasis de las células del hueso. Tras un estímulo iniciador en las células de recubrimiento se promueve la apoptosis de osteocitos que en condiciones basales, secretan el Factor de Crecimiento

Transformante- β (TGF- β), que inhibe la formación de osteoclastos (osteoclastogénesis), lo que se traduce en aumento en la osteoclastogénesis (Raggatt y Partridge, 2010; Ralston, 2017).

La hormona calciotrópica (PTH) es una señal endócrina de remodelación, generada para mantener la homeostasis de calcio, secretada por las glándulas paratiroides en respuesta a bajos niveles de calcio sérico, y actúa de manera periférica sobre los riñones y huesos, y de manera indirecta sobre el intestino. En el microambiente óseo, PTH activa los receptores PTH acoplados a proteínas G en la superficie de osteoblastos. Al unirse a su receptor, activa una cadena de activación de proteínas cinasas y la señalización de calcio intracelular, que induce la transcripción de moléculas encargadas de reclutar precursores de osteoclastos, de inducir la diferenciación y activación de osteoclastos, y establecer la fase de reabsorción (Raggatt y Partridge, 2010).

En la fase de reabsorción, la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), producida por los osteoblastos promueve el reclutamiento de células precursoras de osteoclastos a la zona de reabsorción, donde se fusionan para formar osteoclastos (Raggatt y Partridge, 2010). Otros genes osteoblásticos modulados en respuesta a PTH son el aumento de expresión del ligando de Receptor Activador de NF- κ B (RANKL) y el Factor Estimulador de Colonias-1 (CSF-1), y la reducción de expresión de osteoprotegerina (OPG), que en conjunto, promueven la sobrevivencia y proliferación de osteoclastos (Majidinia et al., 2018).

Metaloproteinasas de la matriz (MMP) también son secretadas por osteoblastos en respuesta a las señales de remodelación. MMPs degradan la matriz osteoide sin mineralizar, y exponen los sitios de adhesión RGD con el hueso mineralizado, lo que es necesario para facilitar el anclaje de osteoclastos. Los osteoclastos maduros forman un espacio extracelular cerrado, al unir sus integrinas $\alpha_v\beta_3$ con los sitios RGD, donde mantienen un pH ácido y secretan proteasas, principalmente colagenasas, metaloproteasa-9, y catepsina K, que disuelven los componentes inorgánicos del hueso en Ca^{2+} y fosfato, y digieren sus componentes proteicos de la matriz mineralizada (Lodish et al., 2016).

En la fase reversa, después de la reabsorción mediada por osteoclastos, las lagunas de Howship permanecen cubiertas con una matriz de colágena desmineralizado sin digerir. Células mononucleares de linaje no determinado elimina estos restos y prepara la superficie para la posterior formación de ECM por osteoblastos (Majidinia et al., 2018).

Durante la fase de formación en la zona de absorción se liberan factores de crecimiento tipo Insulina I y II, y TGF- β que permiten el reclutamiento de células troncales mesenquimales (MSC). Las células MSC se diferencian en osteoblastos. Los osteoblastos secretarán colágeno tipo I e iniciarán el proceso de mineralización, liberando fosfato inorgánico y iones de Ca^{2+} por acción de la fosfatasa alcalina (ALP) y la fosfodiesterasa de nucleótido pirofosfatasa (Hutchings et al., 2020; Raggatt y Partridge, 2010). Las moléculas de unión a calcio como anexinas, osteocalcina, y la sialoproteína ósea, atraen y controlan la acumulación de iones dentro de las vesículas. Las fibras de colágeno son consideradas un factor de inducción de la deposición de cristales de apatita (nucleación) (Bonucci, 2012).

En la fase de terminación, los osteoblastos maduros sufren apoptosis o se diferencian en células de revestimiento. Cuando la proporción de hueso formado es igual al hueso reabsorbido, el ciclo de remodelación ha concluido, y se mantiene hasta que haya una nueva señal (Ralston, 2017).

1.1.3 Regeneración ósea

La regeneración ósea es un proceso que ocurre cuando existe desbalance entre la remodelación y la reabsorción, con la finalidad de recuperar la homeostasis del tejido óseo (**Figura 3**). El desbalance y disfunción de remodelación ósea es la base de desórdenes óseos como osteoporosis y osteoclerosis, defectos óseos originados a partir de un trauma, resección de un tumor, cirugía reconstructiva y malformaciones congénitas (Majidinia et al., 2018).

En respuesta a un trauma óseo, se produce una fase inflamatoria aguda que dura de 24 horas a 7 días, donde se forma un hematoma inicial, con células de sangre periférica e intramedular, plaquetas y fibrina, que forman un coágulo. Células del sistema inmunológico reclutadas en el coágulo liberan interleucinas y factores de crecimiento, como IL-1 y TNF- α , lo que desencadena el reclutamiento y la diferenciación osteogénica de células mesenquimales pluripotenciales a osteoblastos, mediante la expresión de las proteínas morfogénicas óseas BMP2 y BMP7 (Mountziaris y Mikos, 2008).

Durante la fase de renovación, las BMPs pueden promover la liberación de citocinas proinflamatorias, como IL-6, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), para favorecer la angiogénesis y la diferenciación de células endoteliales, osteoclastos, condroblastos y osteoblastos. En esta fase posterior a los 7 a 10 días post-daño, se da origen a un nuevo

tejido fibrovascular a partir del hueso endocondral, se forma un callo cartilaginoso primario compuesto de colágeno tipo II y proteoglicanos (Majidinia et al., 2018; Mountziaris y Mikos, 2008).

La angiogénesis vía angiopoyetina 1 y 2, promueve el crecimiento inicial de vasos en el periostio existentes, mientras que la vía VEGF actúa formando vasos nuevos y regulando osteoblastos y condrocitos hipertróficos que mineralizan la ECM en un ambiente hipóxico. Mediante la vía de señalización de Wnt se regula en conjunto la formación de osteoblastos, lo cual aumenta el depósito de ECM (Majidinia et al., 2018).

Durante la fase de remodelación, factores como RANK, OPG y M-CSF, dirigen la apoptosis de condrocitos y reclutan células MSC con potencial osteogénico para que el callo cartilaginoso posteriormente sea reabsorbido por osteoclastos y mineralizado por osteoblastos y osteocitos para dar origen al nuevo callo rígido (Marsell y Einhorn, 2011).

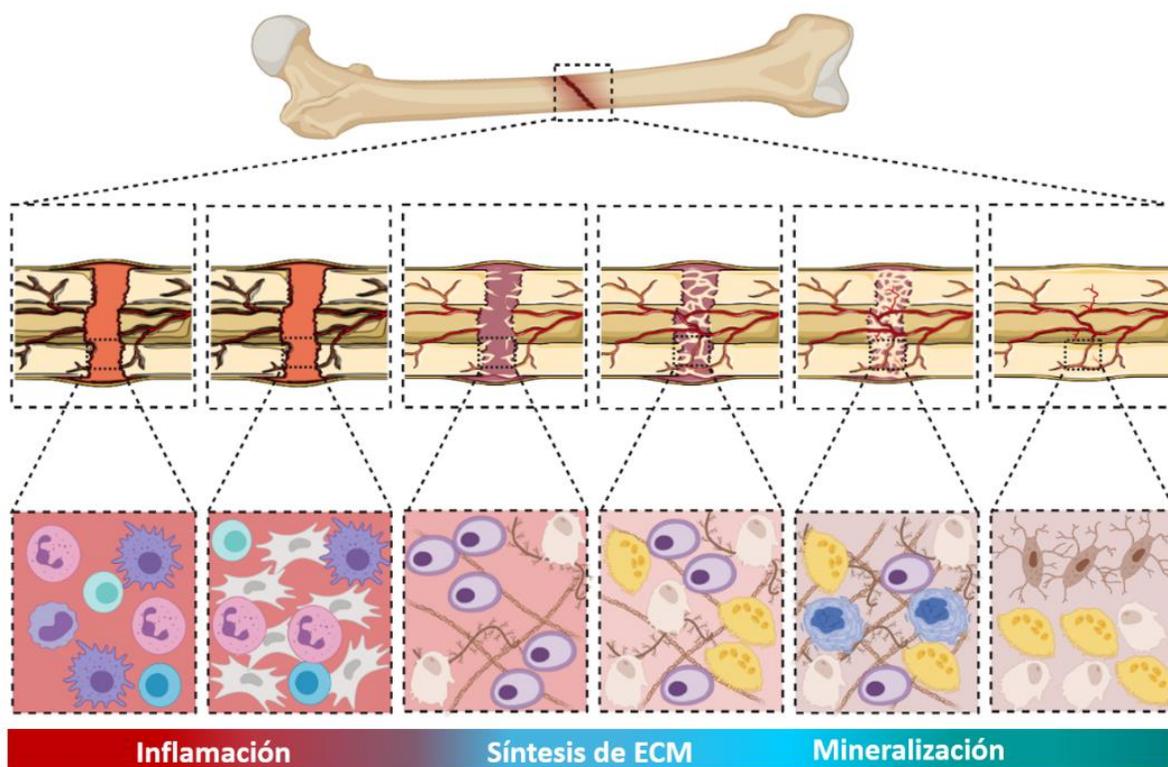


Figura 3. Proceso de regeneración ósea. Representación esquemática de fases que comprenden la regeneración ósea. La fase de inflamación es producida tras un traumatismo, donde se reclutan células del sistema inmunológico. Durante la segunda fase se sintetiza matriz extracelular (ECM) por parte de los osteoblastos, que simultáneamente inician el proceso de mineralización, donde ocurre un recambio de la ECM por parte de los osteoclastos.

1.1.4 Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas en la cadena de transporte de electrones durante la respiración aeróbica para la obtención de ATP. Las ROS son moléculas reactivas con radicales libres, como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot), y pueden influir en funciones biológicas, como la señalización celular y la homeostasis. Los ROS son necesarios para la regulación de la proliferación celular, supervivencia, metabolismo, apoptosis, diferenciación y migración (Agidigbi y Kim, 2019). Sin embargo, cantidades excesivas de ROS pueden causar un desequilibrio celular en las reacciones de reducción-oxidación e interrumpir las funciones biológicas normales, lo que lleva al estrés oxidante.

El estrés oxidante genera un daño celular debido a la oxidación de lípidos, alteración estructural de las membranas, oxidación de ácidos nucleicos y proteínas, causando daño al colágeno y otras proteínas relacionadas a los huesos. Este daño interrumpe la homeostasis del calcio, la mineralización ósea, las interacciones célula-matriz y la unión del colágeno, lo que debilita los huesos con el tiempo (Roberts y Moreau, 2015).

El estrés oxidante afecta el proceso de remodelación, alterando el balance entre la actividad de osteoblastos y osteoclastos, lo que conlleva a defectos óseos y contribuye a desórdenes como la osteoporosis, que se caracteriza por una baja densidad mineral ósea, lo que aumenta el riesgo de fractura (Baek et al., 2010).

En condiciones hipóxicas, la acumulación de ROS en las mitocondrias de osteoclastos, liberan iones de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, e inducen la activación de NF- κ B y la vía de calcineurin-NFAT, lo que promueve un estado inflamatorio y la diferenciación de osteoclastos, respectivamente (Agidigbi y Kim, 2019). En cultivos de células mononucleares de médula ósea, en presencia de altos niveles de ROS, se registró un incremento en el número y actividad de osteoclastos y de enzima TRAP (Baek et al., 2010).

Además de afectar el proceso de remodelación ósea, los ROS inducen la apoptosis de los osteoblastos y los osteocitos, lo que favorece la osteoclastogénesis y la inhibición de la mineralización y la osteogénesis, conllevando a la pérdida ósea (Domazetovic et al., 2017).

1.1.5 Antioxidantes en regeneración ósea

Los antioxidantes naturales son compuestos tioles y polifenoles. El glutatión (GSH, γ -glutamyl-cisteinil-glicina) es un tiol abundante en las células (20mM), determinante del estado oxidativo. La oxidación de GSH a GSSG disminuye la relación GSH/GSSG, lo cual es un indicador de estrés oxidativo (Rahal et al., 2014).

La regulación redox, ayuda a mantener la homeostasis del hueso al mantener los niveles de ROS adecuados. Aunque el GSH puede modular el estado oxidativo, contribuye a la diferenciación de los osteoclastos, y puede reestablecer la actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), aumentando el número de osteoclastos (Agidigbi y Kim, 2019).

Los antioxidantes como la vitamina C y E, la N-acetilcisteína y el ácido α -lipoico, contrarrestan la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, mientras promueven la diferenciación de los osteoblastos y la osteogénesis, y reducen la diferenciación y actividad de los osteoclastos (Domazetovic et al., 2017).

A nivel molecular, previenen la activación de NF- κ B y la expresión de moléculas proinflamatorias como TNF- α , involucrados en la activación de osteoclastos. Además, inhiben el aumento de la actividad de la fosfatasa ácida y proteasas que degradan la matriz ósea en los osteoclastos, e inducen la diferenciación a osteoblastos maduros, la síntesis de fosfatasa alcalina y otros marcadores osteogénicos, como como osteocalcina (Domazetovic et al., 2017).

1.1.6 Ácido α -lipoico

El ácido lipoico- α (ALA) es un derivado del ácido octanoico, precursor de antioxidantes como glutatión (GSH), vitamina C y vitamina B, cuya función principal en el organismo es actuar como cofactor de enzimas mitocondriales encargadas de la obtención de α -cetoácidos (Shay et al., 2008). La forma reducida del ácido lipoico-a puede reaccionar con radicales libres con sus grupos tiol, por lo tanto, regular la señalización inflamatoria y apoptótica (Goraca et al., 2011).

El ALA actúa como modulador transcripcional de genes de síntesis de GSH mediante la activación de Nrf2, elevando la activación de genes para la síntesis de glutatión, como γ -glutamato-cisteína ligasa (γ GCL) y glutatión reductasa (GR). Tras un estímulo de estrés oxidante, Nrf2 se disocia el inhibidor citosólico Keap1,

por lo que puede translocar a núcleo y unirse a elementos de respuesta antioxidante (AREs), promotor de enzimas hemo oxigenasa-1 (HO-1), γ GCL, GR, y aumentar la síntesis de GSH (Zhang et al., 2017). El ALA también puede inhibir directamente a NF- κ B, al limitar la inducción por TNF- α (Shay et al., 2008).

El ALA puede reducir la pérdida ósea al atenuar la señalización de JNK y ERK1/2 (Fontani et al., 2015), disminuyendo la activación de RANKL y esclerostina y aumentando la activación de OPG, lo cual inhibe la diferenciación de osteoclastos y la reabsorción ósea, favorece la formación de osteoblastos e inhibe la apoptosis al inhibir la caspasa 3 (Fontani et al., 2015; Roberts y Moreau, 2015).

Por otra parte, mediante la inhibición de TNF- α y NF- κ B, inhibe la diferenciación y activación de osteoclastos (Roberts y Moreau, 2015) y en células estromales de médula ósea humana previene la apoptosis provocada por altos niveles de ROS (Byun et al., 2005). En modelos de calvaria, el ALA puede prevenir la reabsorción del hueso provocada por RANKL o TNF- α (Kim et al., 2006).

El efecto del ALA ha sido evaluado en el tratamiento de fracturas (Aydin et al., 2014) y prevención de defectos óseos en modelos animales (Fu et al., 2015), ya que puede actuar como antiinflamatorio al inhibir prostaglandinas y citocinas (Byun et al., 2005; Ha et al., 2020), lo que promueve la formación de osteoblastos e inhibe la muerte de osteocitos, mejorando la regeneración ósea. En modelos de ratas ovariectomizadas ha prevenido la pérdida ósea, así como en modelos de cultivo de pre-osteoblastos tratados con ROS promueve la formación de osteoblastos (Fu et al., 2015).

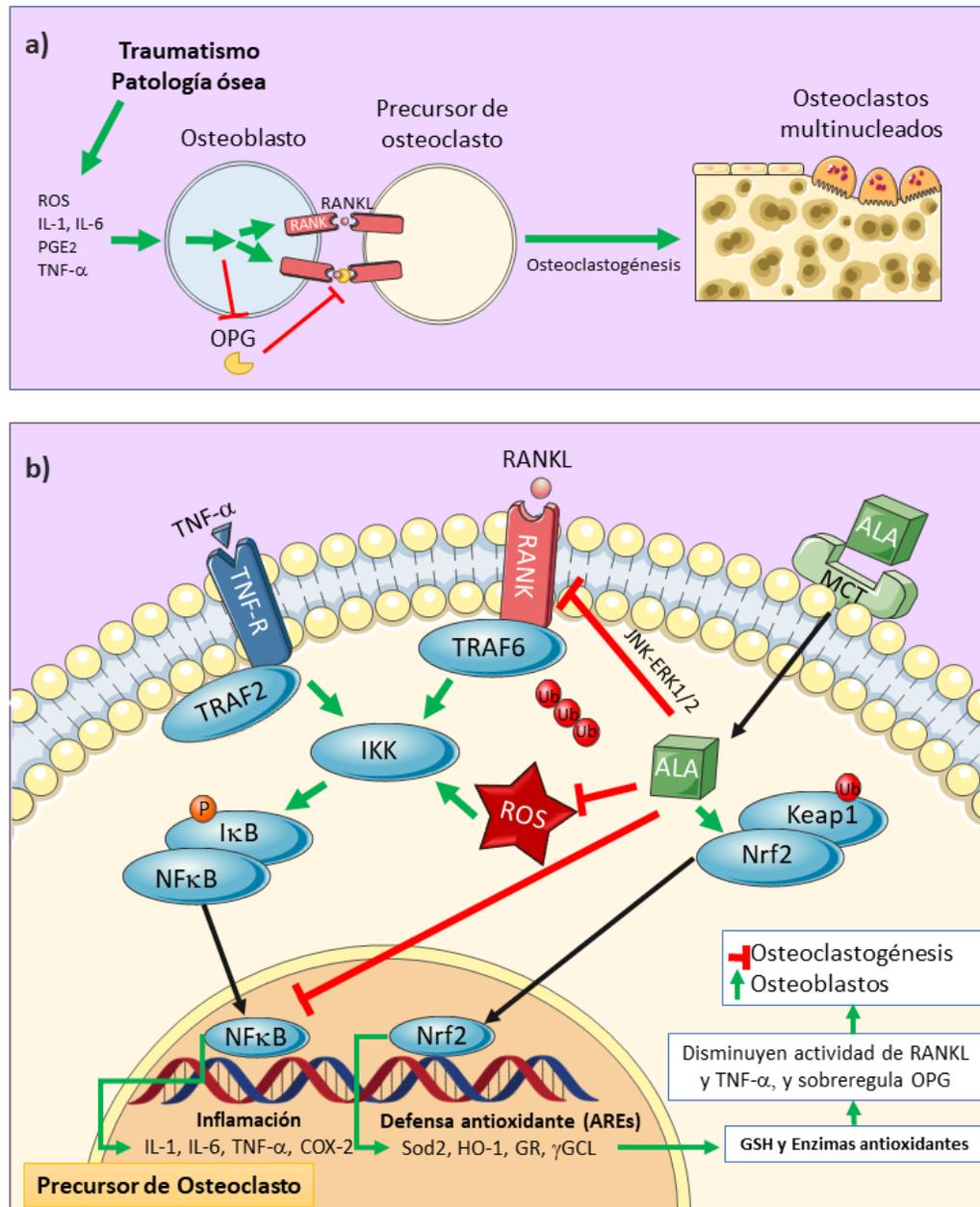


Figura 4. Mecanismo propuesto del papel del ácido α -lipoico en la regeneración ósea. El ALA puede afectar la osteoclastogénesis. a) La unión de factores osteoclastogénicos a los receptores de superficie de osteoblastos, puede sobregular la expresión del ligando del receptor activador del factor- κ B (RANKL) y disminuir la expresión de osteoprotegerina (OPG). RANKL interactúa con el receptor activador del factor- κ B (RANK) de macrófagos y precursores de osteoclastos, lo que activa la maduración de osteoclastos. b) ALA entra a los osteoclastos mediante el transportador MCT. Dentro de la célula puede bloquear la cascada río debajo de RANKL-RANK (causada por estrés oxidante), inhibiendo la unión del factor nuclear κ B (NF κ B) al DNA, inhibiendo la cascada inflamatoria, y sobre regula la expresión de genes de la defensa antioxidante. TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α .

1.1.7 Tratamientos actuales para defectos óseos

Actualmente los trasplantes autólogos son el método estándar para atender lesiones que comprometen la integridad y funcionalidad de un tejido afectado. Defectos óseos que requieren intervención quirúrgica, como traumatismos o resecciones tumorales, involucra la extracción de hueso “donante”, de un sitio que no soporta la carga del paciente, generalmente un sitio de fácil acceso como la cresta ilíaca, y el trasplante en el sitio de defecto (Stevens, 2008).

Los trasplantes autólogos de hueso tienen la mejor respuesta clínica como la integración al tejido circundante del huésped y carece de complicaciones inmunológicas y relacionadas con los trasplantes alogénicos (derivado de cadáver) o xenogénicos (derivado de una fuente animal). Sin embargo, representan una fuente limitada de tejido, que involucra un procedimiento quirúrgico extra, con riesgo de morbilidad posquirúrgica en la zona donadora, incrementa el riesgo de infección y eleva el costo de hospitalización. Los injertos obtenidos de cadáver, pese a que son osteoconductores y no hay morbilidad del sitio donador, pueden transmitir agentes infecciosos o presentar antígenos y ocasionar un rechazo del injerto (Ning et al., 2019).

Dadas las complicaciones de los autoinjertos y aloinjertos óseos, actualmente existen estrategias desarrolladas a partir de la ingeniería de tejidos, a partir de diversos materiales, con la finalidad de sustituir los trasplantes óseos.

1.1.8 Biomateriales para regeneración ósea

Un biomaterial es un material de origen natural o sintético diseñado para evaluar, tratar o sustituir un tejido u órgano dañado, con una finalidad terapéutica, que al implantarse pueda utilizar los mecanismos propios del cuerpo para favorecer la regeneración sin causar efectos adversos (Williams, 2009). Un biomaterial debe ser biocompatible, biodegradable, consistente con el sitio anatómico en que se implanta y resistente a la manipulación quirúrgica (O'Brien, 2011).

Para el caso del hueso, los materiales deben ser preferiblemente osteoinductores (capaces de promover la diferenciación de las células progenitoras en un linaje osteoblástico), osteoconductores (permitir el

anclaje, promover la proliferación y migración celular de células osteogénicas), y capaces de osteointegrarse (implantarse en el tejido sano sin provocar fibrosis) (Basu, 2017).

Los materiales comercializados como sustitutos óseos consisten en matriz ósea desmineralizada de cadáver o de origen bovino o porcino, cerámicas y vidrios bioactivos de sales inorgánicas, polímeros sintéticos, polímeros naturales y polímeros biosintéticos (Elgali et al., 2017; Zárata-Kalfópulos y Reyes-Sánchez, 2006).

Entre los materiales con capacidad de promover la regeneración ósea, los hidrogeles representan una propuesta favorable, ya pueden simular el microambiente de matriz extracelular propicia para la migración y proliferación celular, que favorecen el crecimiento de hueso nuevo (Bai et al., 2018).

Los hidrogeles conforman redes tridimensionales de polímeros entrecruzados y poseen una alta capacidad de absorción de agua, de hasta 1000 veces su peso en seco, según los grupos hidrofílicos disponibles y el tamaño de los poros. El grado de entrecruzamiento puede modificarse para ajustar el tamaño de los poros y las propiedades fisicoquímicas para representar mejor un tejido específico (Ahmed, 2015). La ventaja más sobresaliente de los hidrogeles para la regeneración ósea, es que pueden gelificarse en el sitio de lesión (*in situ*), lo que permite que pueda administrarse de manera inyectable, lo que representa una forma menos invasiva para el paciente (Hernández-González et al., 2019).

1.1.8.1 Uso de alginato en hidrogeles

El alginato es un biopolímero aniónico obtenido de las algas pardas y algunas bacterias, que consiste en cadenas lineales de ácido α -L-glucurónico (G) y ácido β -D-manurónico (M), formadas en bloques GG, MM o GM. Es un biomaterial aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y estudiado en la ingeniería de tejidos por su biocompatibilidad, baja toxicidad, costo relativamente bajo y gelificación suave mediante la adición de cationes divalentes, lo que permite la gelificación *in situ* (Hernández-González et al., 2019; K. Y. Lee y Mooney, 2012). Por tanto, los hidrogeles de alginato se pueden utilizar como sistemas de entrega de compuestos bioactivos como hidroxiapatita y BMP-2 (Barros et al., 2019; Segredo-Morales et al., 2018), así como células mesenquimales troncales y factores de crecimiento encapsulados en la matriz del hidrogel (Gothard et al., 2015; Zhang et al., 2019), matrices para aplicación periodontal (Yang

et al., 2020) y aplicaciones artroscópicas (Resmi et al., 2020), lo que resulta en una mejora en la formación de tejido óseo.

Los hidrogeles de alginato entrecruzados iónicamente se pueden disolver mediante la liberación de iones divalentes que entrecruzan el gel en el medio circundante debido a reacciones de intercambio con cationes monovalentes. Sin embargo, incluso si el gel se disuelve, la principal desventaja es su lenta e incompleta degradación relacionada con el uso de alginatos de alto peso molecular por encima del umbral de depuración renal (> 50 kDa), con la finalidad de obtener propiedades mecánicas similares a las de los tejidos duros (K. Y. Lee y Mooney, 2012).

El desafío en el diseño de hidrogeles de alginato está en modificar los métodos de entrecruzamiento, el peso molecular del alginato, y el procesamiento del alginato para tener las propiedades mecánicas apropiadas y una cinética de degradación sin subproductos tóxicos (Augst et al., 2006; Hernández-González et al., 2019). Una estrategia para hacer que el alginato sea degradable en condiciones fisiológicas incluye la oxidación parcial de las cadenas de alginato, lo que da como resultado residuos de menor peso molecular. El alginato oxidado se puede degradar en medios acuosos, lo que ha demostrado el potencial para formular sistemas de entrega de moléculas bioactivas y células para la regeneración de tejidos (Balakrishnan y Jayakrishnan, 2005).

1.2 Justificación

Desde el año 2000, México cuenta con el Banco de Huesos y Tejidos del Servicio de Traumatología y Ortopedia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, y hasta 2006 había proporcionado 4,175 tejidos, que fueron empleados en 2,451 procedimientos quirúrgicos, de los cuales, 67 % fue requerido en ortopedia y un 32% fue usado por odontólogos (Zárate-Kalfópulos y Reyes-Sánchez, 2006). El Centro Nacional de Trasplantes, ha registrado un aumento en la cantidad de injertos óseos recuperados desde 2015 hasta 2019 obtuvieron 1,749 injertos (CENATRA Centro Nacional de Trasplantes, 2019). Por lo que existe cada vez una mayor demanda de injertos óseos debido al incremento en el número y la complejidad de las cirugías en ortopedia, traumatología, cirugías de columna, maxilofacial y artroscopía.

En México, se estima que existe una prevalencia anual aproximada de caídas de 30%, en donde 10-15% resultan en una fractura. De 2012 a 2013 en el Hospital Servicio de Cadera, Fémur y Rodilla de la Unidad

Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Traumatología y Ortopedia «Lomas Verdes» (HTOLV), se atendieron 1,327 (73.4%) fracturas de fémur, 244 (13.5%) fracturas de la meseta tibial y 238 (13.2%) fracturas de patela. El 66.8% de los pacientes requirieron una estancia intrahospitalaria prolongada mayor a 10 días (Lovato-Salas et al., 2015). En el caso de la fractura de cadera, se considera la consecuencia más grave de las caídas y la osteoporosis. 18% de las mujeres sufrirán una fractura de cadera y 25% muere en el primer año. Sólo 73% de los supervivientes caminará como lo hacía previamente (Viveros et al., 2018), por lo que se consideran actualmente un problema de salud pública en México debido a los gastos hospitalarios e incapacidad laboral que generan (Wong et al., 2007).

Los trasplantes de hueso se indican en pacientes que han tenido destrucción de tejido óseo por traumatismo, patologías oncológicas, recambios de prótesis, principalmente cadera y rodilla; en casos de ruptura de ligamentos cruzados y en ocasiones disponer de un injerto óseo puede evitar la amputación de miembro por cáncer.

Aunque está bien establecido el potencial de los hidrogeles en la ingeniería de tejidos como sistemas de entrega, existe un interés particular en los hidrogeles inyectables que se pueden administrar de una manera menos invasiva que una cirugía, aumentando la comodidad del paciente y reduciendo los tiempos de recuperación, lo que conduce a menores costos de atención médica.

El uso del ácido α -lipoico (ALA) ha emergido en el tratamiento y prevención de defectos óseos, el cual ya se ha demostrado que favorece el proceso de regeneración ósea, actuando como modulador transcripcional de genes de síntesis de GSH e inhibiendo directamente a NF- κ B, lo cual inhibe la diferenciación de osteoclastos, favorece la formación de osteoblastos e inhibe la apoptosis de osteocitos (Fontani et al., 2015; Roberts y Moreau, 2015), sin embargo, actualmente no existen reportes en la literatura de hidrogeles como sistemas de entrega de ALA para promover la regeneración ósea, debido al reto que representa la incorporación de un componente con naturaleza poco hidrosoluble.

El hueso es un tejido trasplantado comúnmente, por lo tanto, diseñar estrategias que nos permitan desarrollar materiales biocompatibles, que simulen estructuras celulares; que sean biodegradables al fungir como andamio temporal de células que permitan el crecimiento de hueso nuevo; y que sean bioactivos para promover la señalización celular sobre el proceso de regeneración tisular, sigue siendo una necesidad clínica.

En este trabajo, buscamos diseñar hidrogeles implantables e inyectables, que actúen como sistema de entrega de ácido α -lipoico, con capacidad antiinflamatoria y antioxidante, para establecer su potencial en la regeneración ósea.

1.3 Hipótesis

Hidrogeles implantables e inyectables a base de alginato con ácido α -lipoico, poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, potenciales para su aplicación en la regeneración ósea.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar y evaluar los efectos de un hidrogel inyectable y un hidrogel implantable, a base de alginato y ácido α -lipoico, en cultivos de pre-osteoblastos de ratón.

1.4.2. Objetivos específicos

- a) Sintetizar y caracterizar la síntesis de hidrogeles implantable e inyectable con ácido α -lipoico.
- b) Evaluar *in vitro* las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes del hidrogel implantable y el hidrogel inyectable con ácido α -lipoico.
- c) Evaluar *in vitro* los efectos en la viabilidad celular de células óseas con hidrogel implantable e inyectable con ácido α -lipoico.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de hidrogeles

2.1.1 Preparación de hidrogel implantable

Los hidrogeles de gelatina se prepararon a una concentración 0.75% (masa/volumen), disolviendo la gelatina en agua destilada a 50 °C. El ácido α -lipoico (Sigma-Aldrich, T5625) se disolvió en etanol absoluto (Fermont, 06061), posteriormente se adicionó el emulsificante Kolliphor EL (Sigma-Aldrich, C5135) en proporción 0.125:1 Kolliphor:Etanol (Kol), y se homogenizaron por vórtex, para obtener soluciones con ácido α -lipoico (ALA) 0.5, 1, 5 y 10 mM.

Las concentraciones de ácido α -lipoico para sintetizar los hidrogeles implantables e inyectables, se determinaron a partir de una concentración 0.5 mM de ALA puede reducir la apoptosis de osteoblastos inducida por especies reactivas de oxígeno (H_2O_2) y TNF- α , molécula pro-inflamatoria (Byun et al., 2005). Mientras que a una concentración 1 mM puede inhibir en mayor porcentaje que 0.1 y 0.5 mM, la osteoclastogénesis (Koh et al., 2005), previene la apoptosis en osteocitos (Fontani et al., 2015) y sobre regula genes osteoblásticos involucrados en la síntesis de ECM (Roberts y Moreau, 2015). La concentración máxima que se pudo emulsificar con la proporción de Kolliphor:Etanol 0.125:1 fue ALA 10 mM, ya que a concentraciones mayores como 20 mM, se precipitaba la mezcla Kol-ALA, en la solución acuosa polimérica (resultados no mostrados). Evaluamos un intervalo de concentraciones 0.5, 1, 5 y 10 mM.

Las soluciones se vertieron en moldes de poliestireno de 24 pozos (Corning, 3526), 600 μ L por pozo, se almacenaron a -20 °C por 24 h y posteriormente se pasaron a -80 °C por 24 h para poder ser liofilizados durante 24 h. Después de liofilizar, los hidrogeles se ingresaron al horno de secado con vacío para permitir el entrecruzamiento de la gelatina, durante 24 h a 140 °C. Los hidrogeles se almacenaron a 4 °C hasta su uso.



Figura 5. Síntesis de hidrogel a base de gelatina 0.75%. Proceso de elaboración de hidrogeles implantables. Los hidrogeles fueron obtenidos a partir de una solución de gelatina 0.75%, a la cual se le adicionó el ALA a 22 °C. Tras ser congelados, se liofilizaron y se entrecruzaron a 140 °C, cada uno de estos procesos fue de 24 h. Cada lote se obtenía después de 4 días y se almacenaron a 4 °C, hasta su uso.

2.1.2 Preparación de hidrogel inyectable

Los hidrogeles inyectables a base de alginato con gelatina se prepararon siguiendo la metodología propuesta por Balakrishnan y Jayakrishnan, (2005) con las siguientes modificaciones: alginato (120,000–190,000 g/mol, Sigma-Aldrich, 180947) 20% (masa/volumen) en etanol absoluto se oxidó con 10.8 g de peryodato de sodio (Sigma-Aldrich, S1878) en agua destilada, con agitación constante por 6 h a 10 °C. La solución de alginato oxidado se dializó (Pur-A-Lizer, Sigma-Aldrich) con agua destilada por 4 días para eliminar el peryodato.

La evaluación de ausencia de peryodato se realizó con la adición de 0.5 mL del alginato dializado a 0.5 mL de nitrato de plata 1% (Sigma-Aldrich, S6506), observando que no hubiera la formación de precipitado.

Posteriormente, el alginato dialdehído 5% (masa/volumen) (ADA5) disuelto en bórax 0.1 M pH 9.4 (Sigma-Aldrich, S9640), se entrecruzó con gelatina 10% (masa/volumen) (G10) precalentada a 40 °C, en una proporción 1:1. El ácido α-lipoico disuelto en etanol, se incorporó a la solución de gelatina, con una proporción de Kol, para tener una concentración final de 0.5, 1, 5 y 10 mM.

La mezcla de ADA5G10 se inyectó con la micropipeta, en un frasco con PBS 1X a 37 °C, donde gelificó después de 15 min. Para realizar las evaluaciones posteriores de estos hidrogeles, se inyectaron 600 μL por pozo de la solución ADA5G10 en moldes de poliestireno de 24 pozos (Corning, 3526), con 1 mL de PBS 1X a 37 °C.

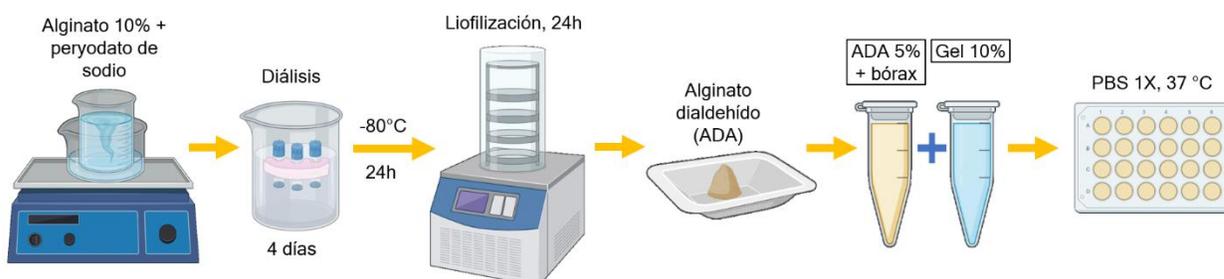


Figura 6. Síntesis de hidrogel inyectable a base de alginato dialdehído 5% con gelatina 10%. Proceso de elaboración de hidrogeles inyectables. Los hidrogeles se obtuvieron a partir de una solución de alginato oxidado, la cual se dializó por 4 días. Tras asegurar que era una solución libre de peryodato, se congeló y liofilizó, por 24 h cada proceso. El alginato dialdehído se rehidrató con bórax, para mezclarse con gelatina 10% y se inyectó en PBS 1X a 37 °C, donde se almacenaron a 22 °C, hasta su uso.

2.2 Caracterización de hidrogeles

2.2.1 Grado de entrecruzamiento

El grado de entrecruzamiento de los hidrogeles ADA5G10 se evaluó con el ensayo de ninhidrina (Sigma-Aldrich, N4876), que determina la cantidad de grupos amino (NH_2) libres presentes en el ADA después de entrecruzarse con la gelatina. Los hidrogeles se cortaron para tener 0.1 g de cada hidrogel. Los hidrogeles se calentaron a 95 °C con 1 mL de ninhidrina 2% por 20 min (Resmi et al., 2020). La solución se dejó enfriar a 22 °C y se leyó la absorbancia a 570 nm. El grado de entrecruzamiento se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de entrecruzamiento, \%} = \frac{(\text{NH}_2)_{nc} - (\text{NH}_2)_c}{(\text{NH}_2)_{nc}} \times 100 \quad (1)$$

Donde $(\text{NH}_2)_{nc}$ es la absorbancia de un hidrogel de gelatina sin entrecruzar, y $(\text{NH}_2)_c$ es la absorbancia del hidrogel de gelatina entrecruzado con alginato (ADA5G10). Para cada formulación de hidrogel ADA5G10 con Kol y ALA, se utilizó el respectivo control de hidrogel de gelatina con Kol y ALA, sin entrecruzar.

2.2.2 Absorción de PBS 1X

La capacidad de absorber líquido de los hidrogeles a base de alginato y a base de gelatina, se evaluaron a lo largo del tiempo, registrando los cambios de peso (W) de los hidrogeles al hidratarlos con PBS 1X (Rubio-Elizalde et al., 2019).

Se pesó cada hidrogel liofilizado (W_L), posteriormente se adicionó 2 mL de PBS 1X y se incubaron durante 15, 30, 60, 90, 120 y 150 min a 37 °C, retirando el exceso de líquido y pesando los hidrogeles (W_S) entre cada intervalo de tiempo. La capacidad de absorción a cada tiempo para cada hidrogel se calculó usando la ecuación:

$$\text{Absorción de PBS 1X, \%} = \frac{(W_S - W_L)}{W_L} \times 100 \quad (2)$$

2.2.3 Microscopía electrónica de barrido y microtomografía computarizada

Imágenes de la estructura de la superficie de los hidrogeles se tomaron usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) HITACHI SU3500 a un voltaje de 5 kV, bajo condiciones de bajo vacío (6 Pa), con detector BSE-Compuesto, a una distancia de trabajo de 12 mm.

La tomografía computarizada de rayos X (μ CT) se realizó con un escáner nano-CT de alta resolución SkyScan 2211 (Bruker, Bélgica), equipado con una fuente de rayos X de tungsteno de 190 kV / 50 μ A - 1 mA y una fuente de rayos X de 11 megapíxeles (4032x2272px) X -Panel CCD sensible a los rayos. Las muestras se escanearon utilizando un voltaje de aceleración de 110 kV y una corriente objetivo de 250 μ A, utilizando una fuente de cobre de 0,5 μ m, con una rotación de muestra completa de 360° (incremento de 0,20°) y un tiempo de exposición de 500 milisegundos por fotograma. La reconstrucción se realizó utilizando la versión 1.7 del software NRecon de Bruker.

Los análisis morfométricos en 3D posteriores se realizaron utilizando la versión 1.19 del software CTAn de Bruker. La resolución de análisis es de 1 micrómetro.

2.3 Evaluación *in vitro* de hidrogeles

2.3.1 Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se determinó mediante la capacidad de remoción del radical óxido nítrico (NO) (Rubio-Elizalde et al., 2019). Los hidrogeles se cortaron en 6 partes y se incubaron con 1.2 mL de nitroprusiato de sodio (SNP) 2.5 mM (Sigma Aldrich, 71778) por 60 min. Posteriormente se homogenizó cada solución con vórtex.

En una placa de 96 pozos se colocó 100 μ L de solución de cada muestra y se adicionaron 100 μ L de reactivo de Griess 1X (Sigma Aldrich, G4410), dejándose incubar por 15 min en oscuridad, para leerse a una absorbancia de 517 nm en lector de placas (Epoch, BioTek).

La remoción de NO, se determinó usando la ecuación (3), donde Abs_c es la absorbancia del reactivo de Griess y SNP con agua, Abs_m es la absorbancia del reactivo de Griess y el SNP con la muestra.

$$Remoción\ de\ NO,\ \% = \frac{Abs_c - Abs_m}{Abs_c} \times 100 \quad (3)$$

2.3.2 Actividad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de los hidrogeles, se cortaron los hidrogeles en 6 partes iguales, y se incubaron por 6 min a 22 °C, protegidos de la luz, con 1.8 mL de solución de ABTS^{•+} (Roche, 11684302001) oxidado previamente (18 h antes) con persulfato de potasio (KPS) 2.5 mM (Sigma Aldrich, 216224).

Después de homogenizar con vórtex cada microtubo, se tomaron 200 μ L de cada muestra y se colocaron en una placa de 96 pozos.

Se midió la densidad óptica a 734 nm de absorbancia (Epoch, BioTek) (Rubio-Elizalde et al., 2019). El porcentaje de inhibición de formación de especies oxidantes se calculó utilizando la ecuación:

$$\text{Inhibición de la oxidación, \%} = \frac{\text{Abs}_c - \text{Abs}_m}{\text{Abs}_c} \times 100 \quad (4)$$

donde Abs_c es el control la absorbancia del ABTS^{•+} con agua y Abs_m es la absorbancia de la muestra.

2.3.3 Hemocompatibilidad

Se obtuvieron muestras de sangre de voluntarios sanos de sexo masculino, mediante punción venosa bajo una técnica aséptica. Cada hidrogel se hidrató con 1 mL de PBS 1X durante 30 min a 37°C. Se agregaron 40 µL de sangre en el PBS 1X, se homogenizó por inversión y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se utilizó PBS 1X y agua destilada como control negativo y positivo, respectivamente. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 700 g y se tomó 200 µL de sobrenadante para leer la absorbancia a 540 nm (Biotek, Epoch) (Ooi et al., 2019). El porcentaje de hemólisis se calculará de la siguiente manera:

$$\text{Hemólisis, \%} = \frac{\text{Abs}_m - \text{Abs}_{cn}}{\text{Abs}_{cp} - \text{Abs}_{cn}} \times 100 \quad (5)$$

donde Abs_m es la absorbancia de la muestra, Abs_{cn} es la absorbancia del control negativo y Abs_{pc} es la absorbancia del control positivo.

2.3.4 Citocompatibilidad

La viabilidad celular se determinó mediante ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, M5655). La viabilidad de los hidrogeles implantables a base de gelatina se evaluó por contacto directo, donde se colocaron los hidrogeles en placas de 24 pozos con 200,000 células por pozo.

Se utilizaron fibroblastos de ratón L929 (ATCC, CRL-6364), cultivados con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), y pre-osteoblastos de ratón MC3T3-E1 (ATCC, CRL-2593), cultivados con medio α -MEM para pre-osteoblastos, suplementados con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%. Se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5%.

La proporción de Kolliphor se determinó cultivando fibroblastos L929. Se sembraron 40,000 células en una placa de 96 pozos, con proporciones del emulsificante (Kol) con medio de cultivo 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1 y 1:1. Tras 24 h de incubación a 37 °C, 5% CO₂, se adicionaron 20 µL de solución MTT a cada pozo. Después de 3 h se adicionó 100 µL HCl 0.01M, SDS 10%, para detener la formación de MTT, dejando incubar por 18 h. La absorbancia se leyó a 570 nm (Epoch, BioTek).

Para evaluar la viabilidad en los hidrogeles, los fibroblastos L929 se incubaron durante 24 h, mientras que los pre-osteoblastos MC3T3-E1 se incubaron por 24 y 120 h.

A los hidrogeles implantables a base de gelatina 0.75%, se agregaron 60 µL de solución MTT a cada pozo, para incubarse por 3 h a 37 °C y CO₂ al 5%. Para detener la formación de MTT, se adicionaron 300 µL HCl 0.01M, SDS 10%, dejando incubar de 18 h. Antes de leer la densidad óptica a 570 nm (Epoch, BioTek), se dejó enfriar la caja por 10 min. Se utilizaron como control las células en monocapa como control positivo, y los hidrogeles sin células con medio y MTT como control negativo.

La viabilidad a las 24 h de cultivo de células MC3T3-E1 en los hidrogeles inyectables a base de alginato dialdehído con gelatina, se determinó con el kit de viabilidad Live/Dead™ siguiendo las especificaciones del fabricante. Las células viables se determinaron mediante la actividad de la esterasa, lo que produce una fluorescencia verde. Las células muertas se determinaron con internalización del homodímero-1 de etidio, lo que produce una fluorescencia roja.

2.4 Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 8. Los resultados de absorción de PBS 1X, capacidad de inhibición de la oxidación, capacidad de remoción de óxido nítrico, porcentaje de hemólisis y viabilidad celular de los hidrogeles de cada polímero fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía, con comparación múltiple de Tukey. Los resultados de viabilidad de las células MCT3-T3 a las 24 y 120 h, fueron analizados por ANOVA de dos vías, con comparación múltiple de Sidak. La capacidad de absorción de PBS 1X fue analizado mediante un ANCOVA, con comparación múltiple de Tukey, utilizando el software Statistica. Cada condición de hidrogeles se analizó por triplicado (n=3). Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos por $p < 0.05$, donde un valor de 0.12 es considerado no significativo, 0.033 (* o una letra), 0.002 (** o dos letras), y < 0.001 (***) o tres letras).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Hidrogeles implantables e inyectables

Para establecer las condiciones de síntesis de los hidrogeles, se determinó la cantidad de Kolliphor para emulsificar el ALA en los hidrogeles mediante un ensayo de viabilidad celular colorimétrico con MTT. A partir del cultivo de células L929 con proporciones volumen/volumen de Kolliphor con medio de cultivo, incubadas durante 24 h a 37 °C, 5% CO₂. En comparación con la monocapa de células, la proporción 0.125:1, obtuvo una viabilidad del 98.03%, el resto de las proporciones disminuyeron significativamente la viabilidad celular a un 65.56% con la proporción 0.25:1; 60.09% con 0.5:1; 48.14% con 0.75:1 y 42.08% con 1:1 (**Figura 7**), por lo que la proporción 0.125:1 no afecta la viabilidad celular.

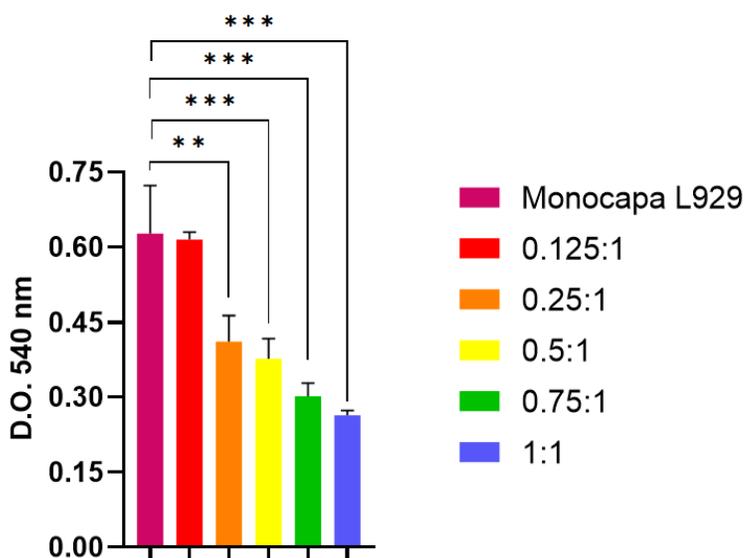


Figura 7. Viabilidad de células L929 cultivadas con proporciones de emulsificante con medio de cultivo. Efecto de las proporciones de Kolliphor:medio de cultivo 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1, 1:1 en la viabilidad de las células L929 a las 24 h de cultivo, con MTT. La monocapa de células L929 no posee ninguna proporción de Kol. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos por $p < 0.05$, donde un valor de 0.12 es considerado no significativo, 0.033 (*), 0.002 (**), y < 0.001 (***).

A partir de los resultados de la **Figura 7**, se seleccionó la proporción 0.125:1 de Kolliphor:medio de cultivo. Para la fabricación de hidrogeles se sustituyó la proporción de medio de cultivo por etanol absoluto para disolver el ácido α -lipoico (ALA).

Tras determinar la proporción de Kol que se emplearía para sintetizar los hidrogeles, el siguiente paso fue establecer la concentración de ALA. Para determinar la concentración de ALA que se usaría para evaluar la actividad biológica de los hidrogeles, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular con MTT, con fibroblastos L929 cultivados con hidrogeles implantables a base de gelatina 0.75% y concentraciones de ALA 0.5, 1.5 y 10 mM. Se sembraron 200,000 células L929 con el volumen total de medio (500 μ l) en los hidrogeles implantables a base de gelatina 0.75%, después de 24 h de incubación en condiciones estándar, se llevó a cabo el protocolo de MTT. En comparación con la monocapa, la viabilidad de las células no se ve afectada en las formulaciones de hidrogeles a base de solo gelatina 0.75 (Gel), ni cuando se le agregó Kol, y ALA 10 mM, donde los valores se mantuvieron similares. Cuando se tenía las formulaciones con ALA 0.5, 1 y 5 mM, la viabilidad celular aumentó 9%, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 8).

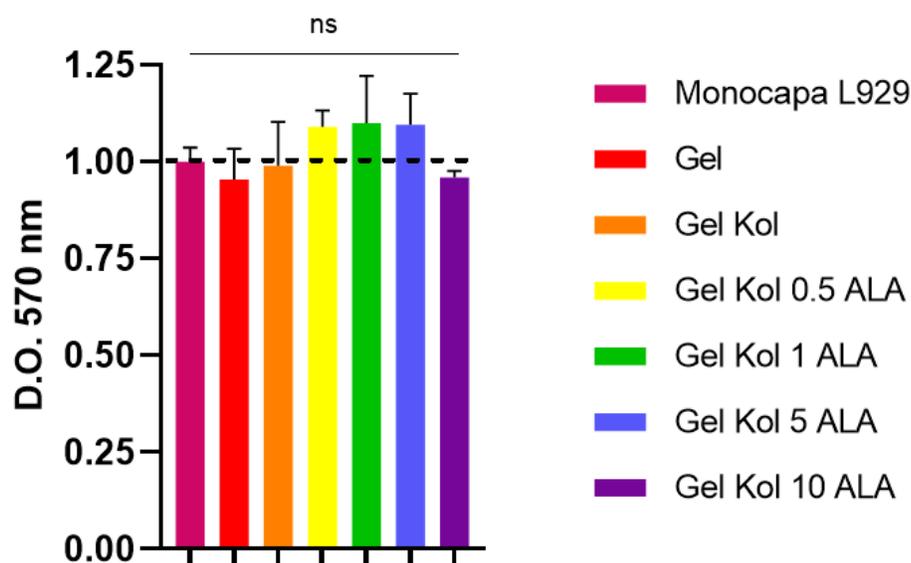


Figura 8. Viabilidad de células L929 cultivadas en hidrogeles implantables. Efecto en la viabilidad celular, de los hidrogeles a base de gelatina 0.75% (Gel), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y con ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA) con células L929 tras 24 h de cultivo. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). La comparación múltiple entre los grupos no fue estadísticamente significativa (ns).

A partir de los resultados de **Figura 7** y **Figura 8**, se establecieron las concentraciones de síntesis de los hidrogeles implantables e inyectables. Sealizaron cinco formulaciones de hidrogeles implantables e inyectables, respectivamente, con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol) en concentraciones 0.5, 1 y 5 mM, ya que

fueron las que demostraron tener mayor viabilidad celular en nuestros ensayos de citocompatibilidad con MTT (**Figura 8**).

Los hidrogeles implantables a base de gelatina se obtuvieron a partir de una solución de gelatina 0.75%, precalentada a 50 °C. Después de dejar enfriar la solución a 22 °C, se añadieron los componentes de cada formulación, previamente preparados. Luego de colocar 600 µL de cada solución, por pozo, los moldes se colocaron en el congelador a -80 °C, por 24 h. Los hidrogeles congelados se liofilizaron 24 h, luego se desmoldaron y se colocaron en el horno de secado al vacío para llevar a cabo el entrecruzamiento térmico de la gelatina a -140 °C, por 24 h. Después de 4 días de procedimiento, se obtienen los hidrogeles finales, y se almacenan a 4 °C, hasta su uso (**Figura 9**).



Figura 9. Fotografía de los hidrogeles implantables. Se sintetizó un hidrogel “blanco” a base de sólo polímero, gelatina 0.75% (Gel). Como otro control, se sintetizó un hidrogel con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol). Se sintetizaron 3 formulaciones de hidrogeles con ácido α -lipoico, 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA).

Los hidrogeles a base de alginato dialdehído 5% con gelatina 10% (ADA5G10), se obtuvieron a partir de la oxidación del alginato de sodio con peryodato de sodio (NaIO_4), para modificar en el alginato los grupos hidroxilo, a grupos aldehídos reactivos a grupos amino de la gelatina (**Figura 10**). Para eliminar el peryodato del alginato dialdehído (ADA), la solución de alginato oxidado se colocó en membranas para diálisis en agua destilada (por cada mL de alginato oxidado se colocaron 1000 mL de agua), la cual se cambió cada 24 horas. Después de 4 días de diálisis se evaluó la presencia de peryodato de sodio, adicionando solución de nitrato de plata. Al no observar la formación de precipitado de yoduro de plata, se determinó que la muestra de ADA es libre de peryodato (**Figura 11**).

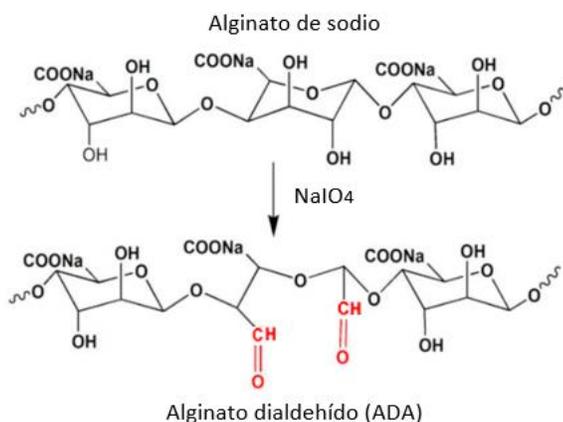


Figura 10. Oxidación del alginato de sodio con peryodato de sodio. Representación esquemática del proceso de oxidación del alginato de sodio, al agregar peryodato de sodio se obtiene alginato dialdehído (ADA). En rojo se indica la formación de los nuevos grupos aldehído.

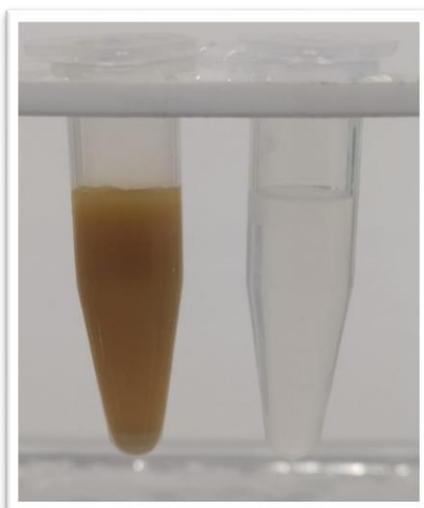


Figura 11. Determinación de ausencia de peryodato de sodio. Muestras tratadas con solución de nitrato de plata 1%. Tubo de muestra de ADA sin dializar (izquierda) forma yoduro de plata al contener peryodato de sodio, la muestra de ADA después de 4 días de diálisis (derecha) es libre de peryodato por lo tanto no lleva a cabo reacción alguna.

El ADA dializado se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, para posteriormente ser liofilizado. Para estabilizar los grupos aldehídos del ADA, el ADA liofilizado se rehidrató en tetraborato de sodio 0.1 M pH 9.4, con una concentración 5% (masa/volumen). El complejo ADA-borato permite que los grupos aldehído del alginato se encuentren disponibles para formar la base de Schiff ($\text{C}=\text{N}$) con los grupos amino de la gelatina (**Figura 12**). La solución de ADA 5% se mezcló con una solución de gelatina 10% a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una proporción 1:1 y se inyectó con una micropipeta en un frasco con PBS 1X a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A la solución de gelatina se le adicionó el ácido α -lipoico, para obtener una concentración final 0.5, 1 y 5 mM (**Figura 13**).

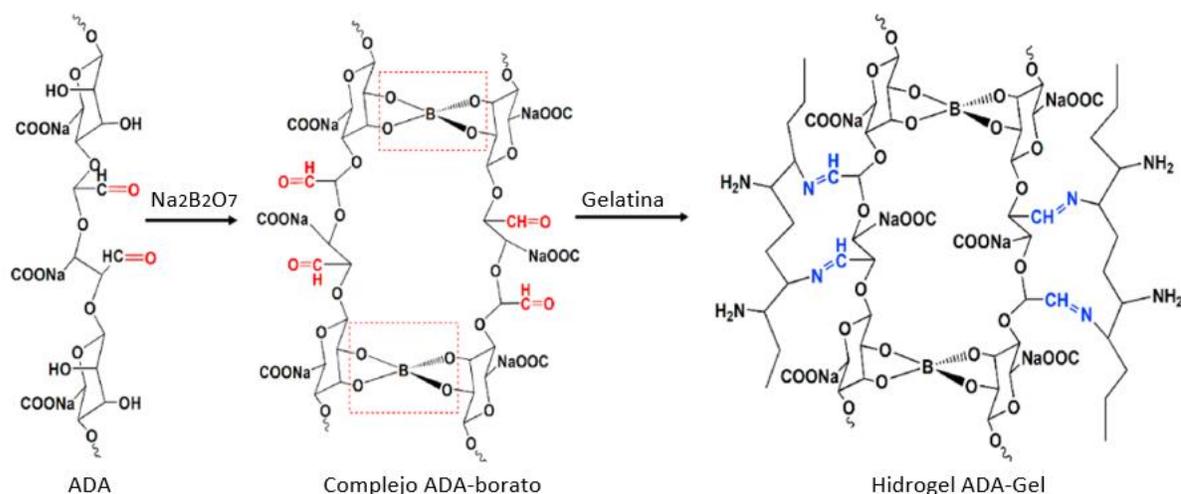


Figura 12. Formación del hidrogel inyectable. Representación esquemática de la adición de bórax al ADA (paso 1), que da lugar a la formación del complejo ADA-borato (paso 2), el cual en presencia de la gelatina da lugar a la formación de la base de Schiff (azul) para obtener finalmente el hidrogel inyectable (paso 3).

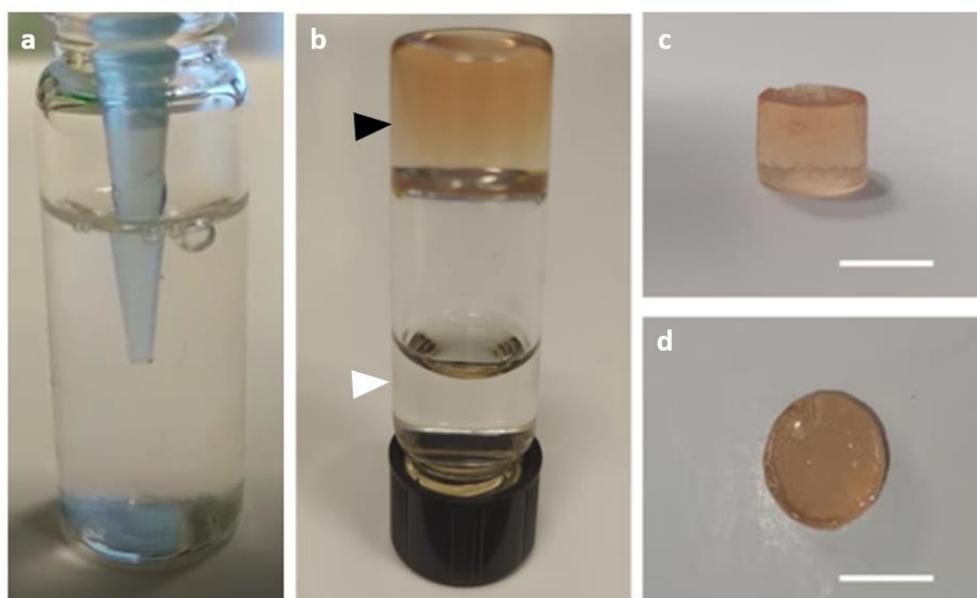


Figura 13. Obtención de hidrogel inyectables. a) La solución de alginato dialdehído 5% se mezcló con solución de gelatina 10%, en proporción 1:1. Se inyectó con la punta de la micropipeta en un frasco de vidrio con PBS 1X a 37 °C. b) Después de 15 min se observa completamente gelificado el hidrogel (flecha negra), sin diluirse en el PBS 1X (flecha blanca). c, d) Hidrogel inyectable después de 15 min. La barra de escala representa 1 cm.

Para realizar las evaluaciones de absorción de PBS 1X, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria y biocompatibilidad, se prepararon hidrogel inyectables en moldes de poliestireno de 24 pozos. Se inyectaron 600 μL de cada solución formulada, en placas de 24 pozos, con 1 mL de PBS 1X a 37 °C (**Figura**

14). Para realizar los ensayos de viabilidad celular con el kit Live/Dead™, se realizaron hidrogeles en placas de 96 pozos con un hidrogel con un volumen de 150 μL por pozo.

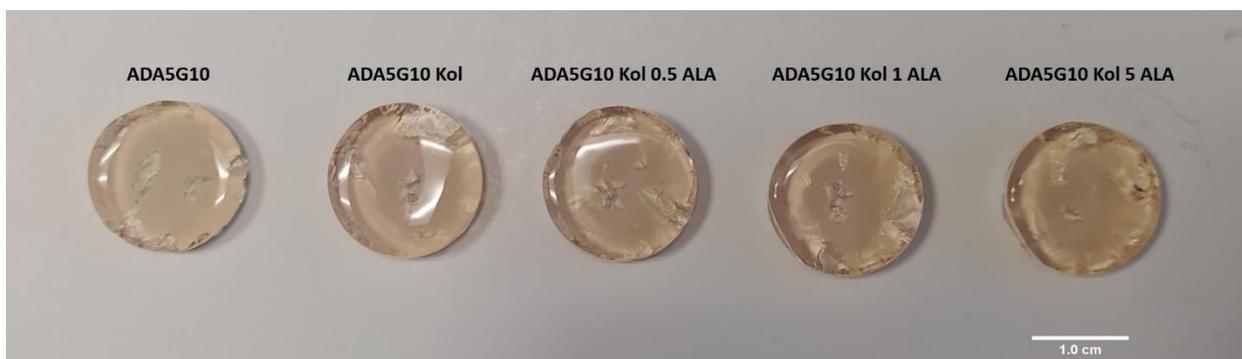


Figura 14. Fotografía de los hidrogeles inyectables. Se sintetizó un hidrogel “blanco” a base de solo alginato dialdehído 5% gelatina 10% (ADA5G10), y como segundo control, se sintetizó uno con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol). Se sintetizaron tres hidrogeles con ácido α -lipoico, a 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA).

3.2 Caracterización de hidrogeles

3.2.1 Análisis microscópico

Para conocer la microtopografía de los hidrogeles implantables, fueron visualizados en microscopio electrónico de barrido y analizados con ImageJ para determinar el tamaño de los poros en el área seleccionada, de la **Figura 16**.

Los hidrogeles de Gel tienen una porosidad de 49.54%, con un total de 1,449 poros de diámetro en un rango de 5-220 μm . Los hidrogeles Gel Kol tienen una porosidad de 31.91%, con 1,805 poros con un rango de 5-274 μm , mientras que aquellos que tienen ALA 5 mM, poseen 4,002 poros de tamaño en un rango de 8-280 μm de diámetro, una porosidad de 26.044%. Lo cual indica que mientras se agregan componentes al hidrogel, el número de interconexiones de la red polimérica aumenta (**Figura 16**).

Mediante microtomografía computarizada se pudo obtener una reconstrucción tridimensional de la microtopografía de los hidrogeles implantables, y las formulaciones equivalentes de los hidrogeles inyectables (**Figura 15**). En el caso de los hidrogeles implantables, se observa que el tamaño de poro

disminuye al agregar componentes al hidrogel a base de gelatina, mientras aumenta la cantidad de interconexiones en la red polimérica, corroborando lo observado en SEM.

En los hidrogeles inyectables a base de alginato dialdehído 5% con gelatina 10%, se observa que los poros poseen estructuras más alargadas, en comparación a los poros semiesféricos de los hidrogeles implantables. A diferencia de los hidrogeles implantables, los hidrogeles inyectables parecen tener mayor número de interconexiones y poros más pequeños y semicirculares cuando se tiene el hidrogel de la solución polimérica sin componentes adicionales, mientras que cuando se le agrega Kol, el número de interconexiones se ve disminuido y los poros son más grandes. Cuando se agrega ALA 5 mM, los poros dejan de ser semicirculares y tienen un perfil poliédrico de mayor tamaño, lo que reduce el número de interconexiones (**Figura 15**).

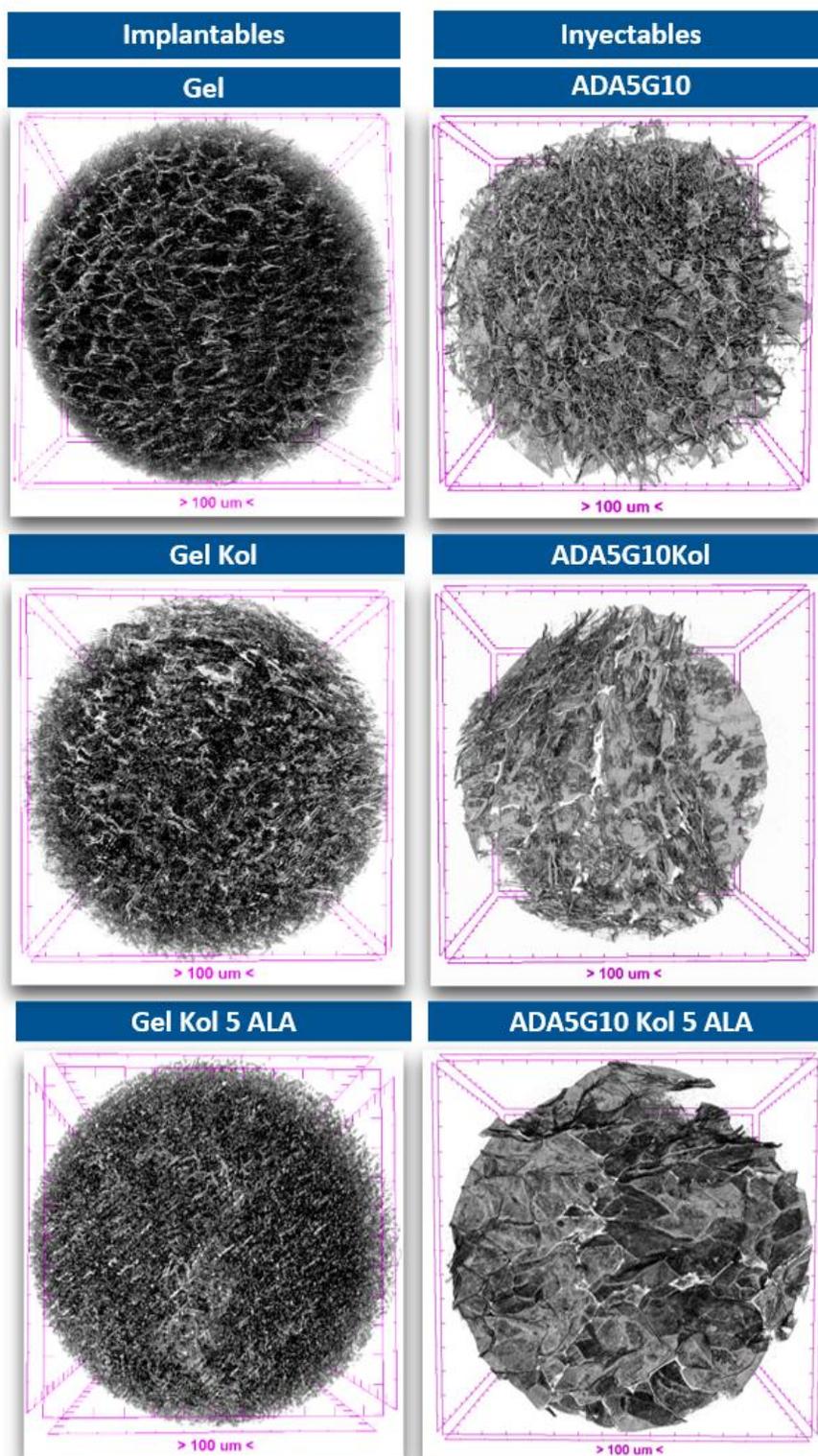


Figura 15. Caracterización estructural por microtomografía computarizada de hidrogeles implantables e inyectables. Se reconstruyeron tridimensionalmente los hidrogeles “blanco” a base de sólo polímero, con Kolliphor:Etanol, y con ALA 5 mM, para cada tipo de hidrogel. Gelatina 0.75% (Gel), Alginato dialdehído 5% gelatina 10% (ADA5G10), Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), ácido α -lipoico 1 mM (1 ALA), ácido α -lipoico 5 mM (5 ALA). Cada recuadro está delimitado con intervalos de 100 μ m.

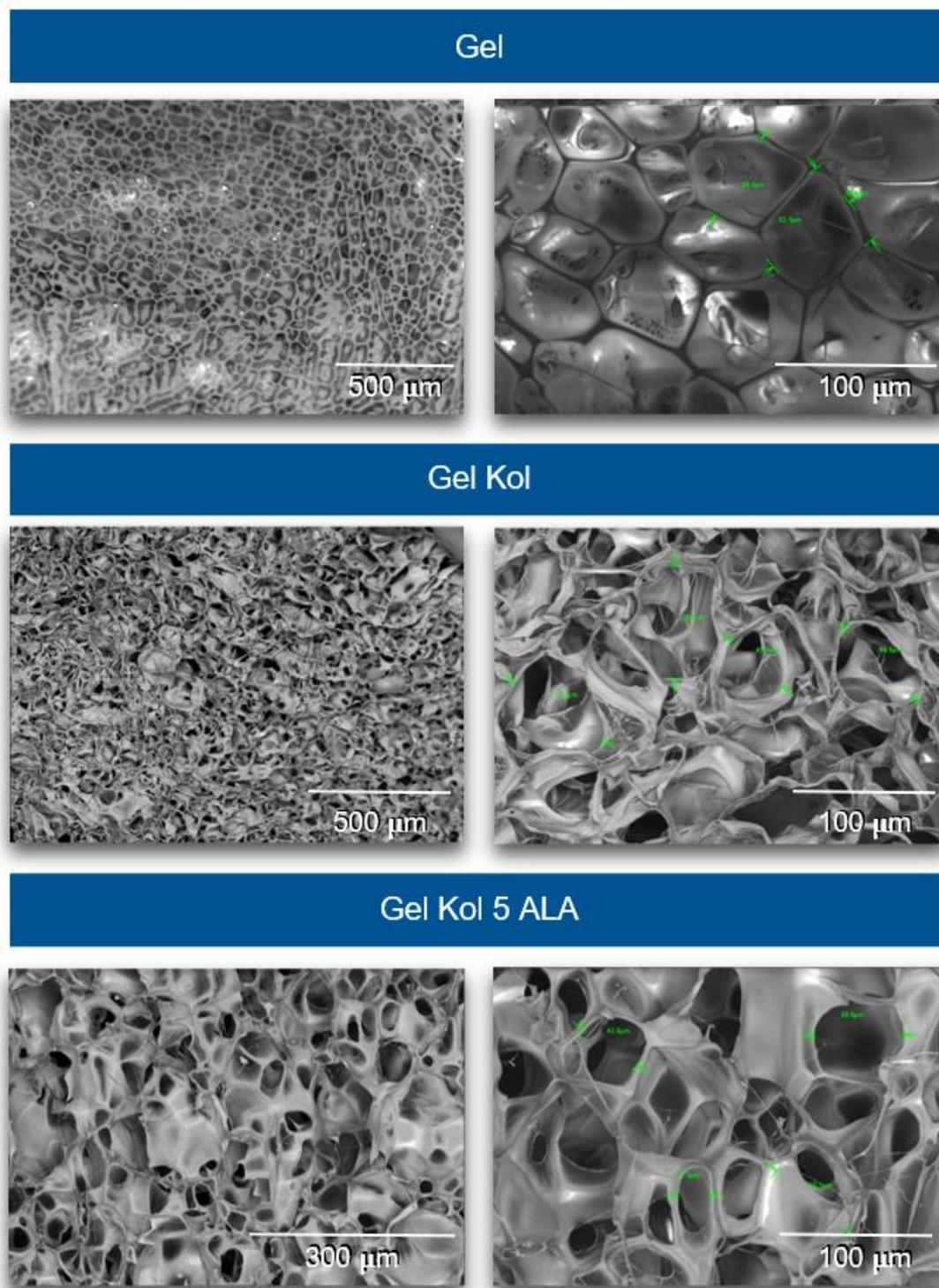


Figura 16. Caracterización morfológica por SEM de hidrogeles implantables. Se visualizó la microestructura de los hidrogeles a base de gelatina 0.75% (Gel), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y con ácido α -lipoico 5 mM (5 ALA). Las fotos de lado izquierdo están a una escala de 500 μm , a excepción de Gel Kol 5 ALA que está a 300 μm . Las fotos de lado derecho son un aumento con escala a 100 μm , se indica con flechas verdes el diámetro de poros representativos de cada campo.

3.2.2 Grado de entrecruzamiento

La reacción del alginato dialdehído con la gelatina se lleva a cabo por la formación de la base de Schiff, donde se entrecruza el carbono de los aldehídos del alginato con el nitrógeno de las aminas de la gelatina (**Figura 17**).

Para conocer el grado de entrecruzamiento de las formulaciones de hidrogeles ADA5G10, se incubaron con ninhidrina para determinar por colorimetría la cantidad de grupos amina libres. Los hidrogeles ADA5G10 se entrecruzaron un 41.66%, mientras que los hidrogeles ADA5G10 con K:E 0.125:1 tuvieron un 56.97% de entrecruzamiento. Cuando se agregó el ALA, el grado de entrecruzamiento aumentó a 72.66% cuando se tenía ALA 0.5 mM, y fue disminuyendo a medida que aumentamos la concentración de ALA, a un 65.29% cuando el hidrogel tenía 1 mM de ALA, y a 57.91% cuando tenía ALA 5 mM.

El grado de entrecruzamiento aumenta a medida que incorporamos componentes al hidrogel, sin embargo, el grado va disminuyendo conforme aumenta la concentración de ALA.

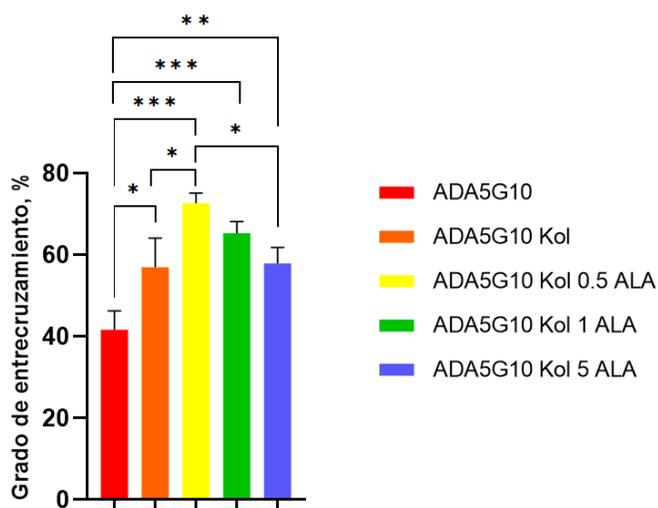


Figura 17. Grado de entrecruzamiento de hidrogeles inyectables. El grado de entrecruzamiento determinado con ninhidrina 2%, de los hidrogeles a base de alginato dialdehído 5% gelatina 10% (ADA5G10), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA), aumenta al incorporar componentes al hidrogel. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos por $p < 0.05$, donde un valor de 0.12 es considerado no significativo, 0.033 (*), 0.002 (**), y < 0.001 (***)

3.2.3 Absorción de PBS 1X

Las formulaciones de los hidrogeles a base de alginato de calcio y a base de gelatina fueron evaluados con respecto a su capacidad de absorción de líquido, al ser sumergidos durante 15, 30, 60, 90, 120 y 150 min en 2 mL de PBS 1X a 37 °C.

Los resultados de los hidrogeles a base de solo gelatina alcanzan un 3,455.27% de capacidad de absorción de PBS 1X, estando por debajo de la capacidad de absorción del resto de formulaciones. Los hidrogeles que tienen Kol alcanzan un 4681.62%. Aquellos que tienen ácido α -lipoico poseen un porcentaje de absorción de 4,897.59% (0.5 mM), 4,286.26% (1 mM), y 4,864.38 (5 mM), después de 30 min. Esta capacidad de absorción se mantuvo constante después de 90 min, a lo largo del tiempo hasta 150 min (Figura 18).

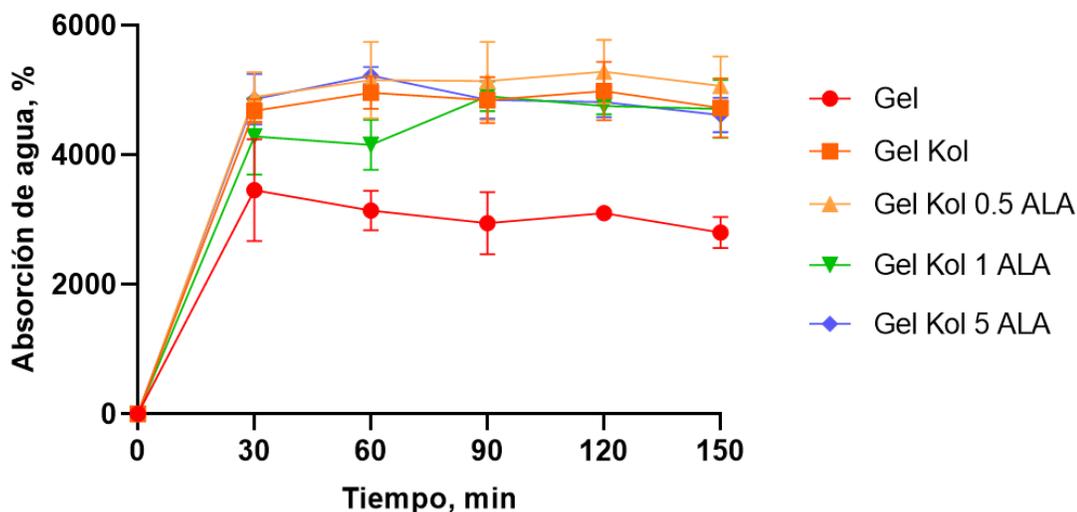


Figura 18. Capacidad de absorción de PBS 1X de hidrogeles implantables. La capacidad de absorción de los hidrogeles a base de gelatina 0.75% (Gel), es menor que la de los hidrogeles con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), 5 mM (5 ALA). Después de 90 min ya no aumenta la capacidad de absorción y se mantiene constante. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo).

Las formulaciones de hidrogeles ADA5G10 alcanzan 978.10% de absorción de PBS 1X, cuando se agrega Kol, alcanza un 927.05%, después de 30 min. Al adicionar ácido α -lipoico la capacidad de absorción de líquido es mayor cuando se tiene ALA 0.5 mM, con 974.05%, y esta disminuye cuando se tiene ALA 1 mM, 935.59% y ALA 5 mM, 937.67%. Después de 90 min alcanzan una máxima capacidad de absorción, la cual se mantiene con valores similares sin significancia estadística, hasta los 150 min, a excepción de la

formulación ADA5G10 Kol 5 ALA que alcanza su máxima capacidad de absorción en este tiempo con un 1,278.14% (Figura 19).

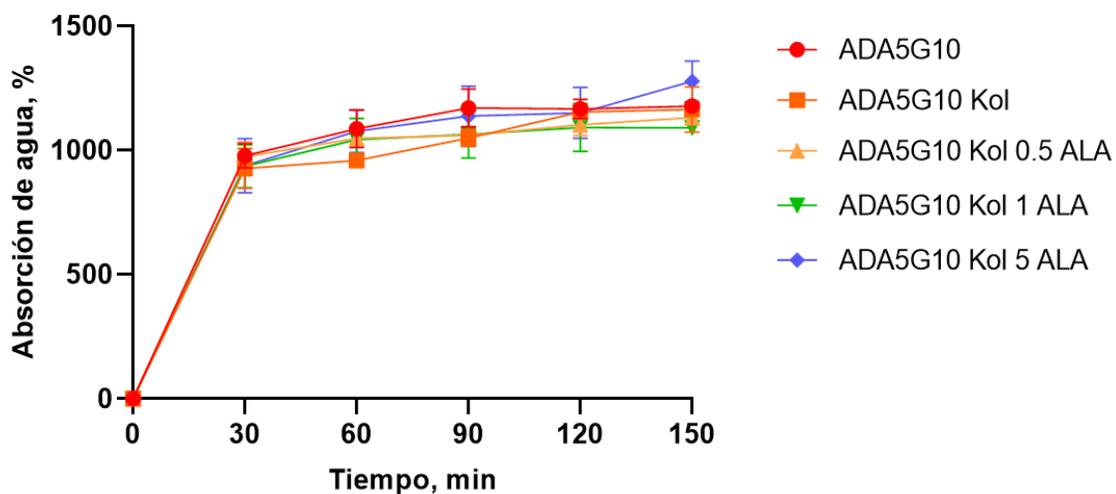


Figura 19. Capacidad de absorción de PBS 1X de hidrogeles inyectables. El perfil de capacidad de absorción de los hidrogeles de alginato dialdehído 5% gelatina 10% (ADA5G10), Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA) se mantiene con valores similares sin significancia estadística. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo).

Los hidrogeles implantables que tuvieron menor número de poros tuvieron menor capacidad de absorción de PBS 1X, y al ir adicionando componentes al hidrogel, la capacidad de absorber líquido aumentó. Mientras que los hidrogeles inyectables a pesar de tener una microtopografía diferente entre las formulaciones y diferente grado de entrecruzamiento, tuvieron una capacidad de absorción de PBS 1X similar.

El siguiente paso después de la caracterización fisicoquímica de los hidrogeles, es determinar que el ALA cargado en los hidrogeles mantiene su potencial bioactivo, en ambas vías de síntesis. Por lo tanto, se evaluó la actividad antiinflamatoria y antioxidante de las formulaciones de los hidrogeles implantables e inyectables.

3.3 Evaluación *in vitro* de hidrogeles

3.3.1 Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se determinó mediante la capacidad de los hidrogeles para remover óxido nítrico (NO^*) donado por nitroprusiato de sodio (SNP). Los hidrogeles se incubaron por 1 h con SNP, y al sobrenadante recuperado se le agregó el reactivo de Griess 1X para cuantificar por colorimetría la cantidad de NO^* a 540 nm.

Los hidrogeles de gelatina 0.75% no poseen actividad antiinflamatoria en términos de remoción de NO^* , sin embargo, aquellos que tienen Kol alcanzan un 29.58% de capacidad de remoción de óxido nítrico, mientras que los hidrogeles que poseen ácido α -lipoico tienen 16.83%, 24.41% y 15.82% cuando se tiene ALA 0.5, 1 y 5 mM respectivamente (**Figura 20**).

Los hidrogeles de alginato dialdehído con gelatina ADA5G10, alcanzaron un 95.23% de capacidad de remoción de NO^* , cuando se adicionó Kol tuvo un 82.81%. Cuando se tiene ALA, alcanzan un 92.85%, 96.06% y 95.75% de remoción de NO^* , respectivamente (**Figura 21**).

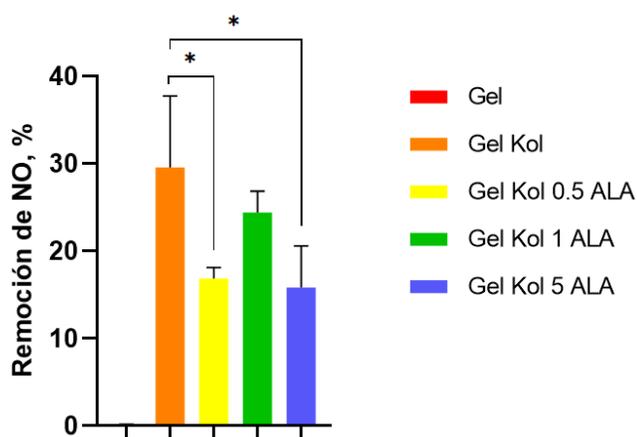


Figura 20. Capacidad antiinflamatoria de hidrogeles implantables. La actividad antiinflamatoria expresada en términos de remoción de óxido nítrico de los hidrogeles a base de gelatina 0.75% (Gel), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y con ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), 5 mM (5 ALA) incrementó de manera significativa cuando se adicionaron componentes al hidrogel de solo gelatina. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos por $p < 0.05$, donde un valor de 0.12 es considerado no significativo, 0.033 (*).

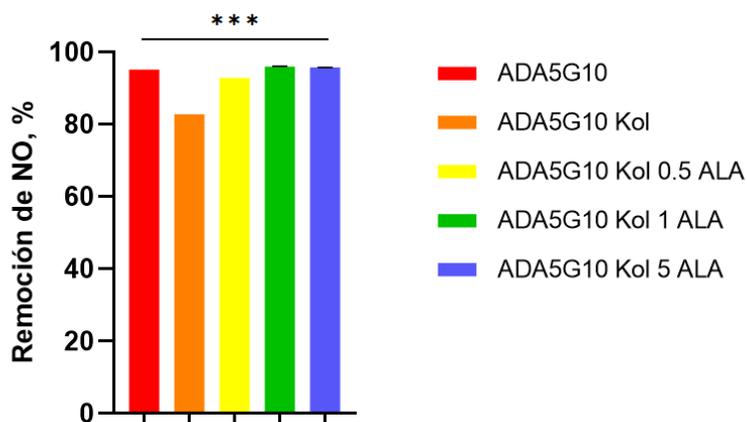


Figura 21. Capacidad antiinflamatoria de hidrogeles inyectables. La actividad antiinflamatoria expresada en términos de remoción de óxido nítrico de los hidrogeles a base de alginato dialdehído 5% gelatina 10% (ADA5G10), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y con ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA) se mantiene con valores similares y desviaciones estándar pequeñas o indistinguibles. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos por $p < 0.05$, donde un valor de < 0.001 , es considerado significativo (***) .

Los hidrogeles implantables poseen una menor capacidad de remoción de NO* en comparación con los hidrogeles inyectables, por lo que estos tienen un mayor potencial como agentes antiinflamatorios. Sin embargo, no es posible determinar cual tendría mejor actividad biológica con estos resultados, ya que el proceso inflamatorio es necesario para la señalización celular, y demasiada actividad antiinflamatoria podría ser perjudicial para el proceso de regeneración.

3.3.2 Actividad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de los hidrogeles, se colocaron en contacto con el radical ABTS** en solución, y se midió la capacidad de inhibir la oxidación del radical por colorimetría a 734nm de absorbancia.

Los hidrogeles a base de gelatina 0.75% pueden inhibir la oxidación un 53.16%, cuando tiene Kol un 54.18%, ALA 0.5 Mm, 51.82%; 1 mM, 56.59%; e incrementó a 62.17% cuando se tenía ALA 5 mM (**Figura 22**).

Las formulaciones de hidrogeles ADA5G10 alcanzaron valores similares a $191.04 \pm 0.25\%$ de capacidad de inhibición de la oxidación de ABTS^{•+}, por lo que inhibieron en su totalidad la oxidación del radical ABTS^{•+} (Figura 23).

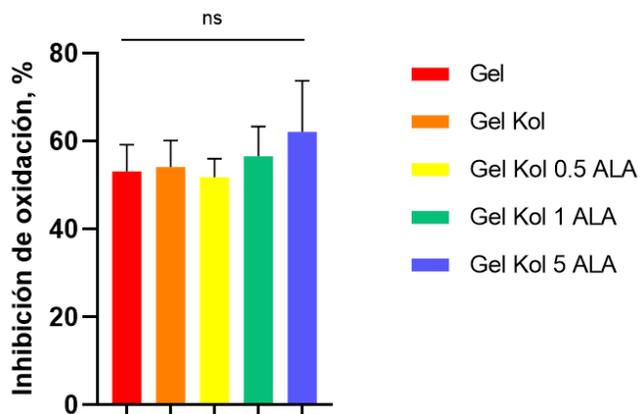


Figura 22. Capacidad antioxidante de los hidrogeles implantables. La actividad antioxidante en términos de inhibición de la oxidación del ABTS de hidrogeles a base de gelatina 0.75% (Gel), Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA), se mantuvo con valores similares. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). La comparación múltiple entre los grupos no fue estadísticamente significativa (ns).

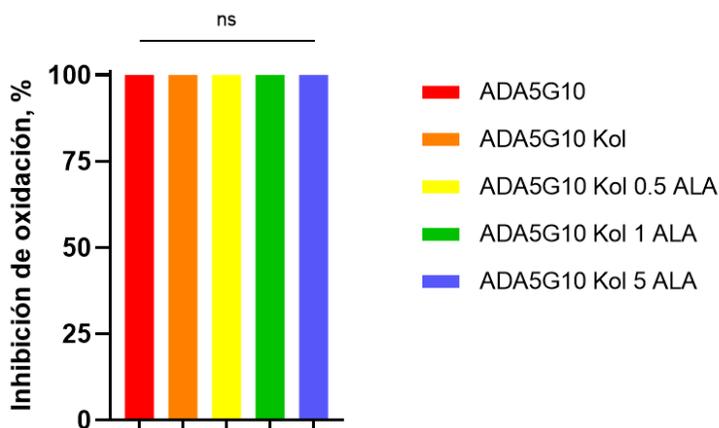


Figura 23 Capacidad antioxidante de los hidrogeles inyectables. La actividad antioxidante en términos de inhibición de la oxidación del ABTS de hidrogeles a base de alginato dialdehído 5% gelatina 10% (ADA5G10), Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), ácido α -lipoico 1 mM (1 ALA), ácido α -lipoico 5 mM (5 ALA), inhibieron por completo la oxidación del ABTS. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). La comparación múltiple entre los grupos no fue estadísticamente significativa (ns).

Ambos hidrogeles demostraron tener capacidad de inhibición de la oxidación del radical ABTS^{•+}, por lo que tienen el potencial como sistemas antioxidantes capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno.

3.3.4 Hemocompatibilidad

Para determinar la biocompatibilidad con componentes sanguíneos, se determinó el porcentaje de hemólisis el cual se representa en términos de liberación de hemoglobina por la ruptura de los eritrocitos. Según la ISO 10993-1 un porcentaje de hemólisis por debajo del 5% establece uno de los criterios para demostrar la hemocompatibilidad de los biomateriales.

Las cinco formulaciones de los hidrogeles implantables e inyectables se incubaron con sangre de voluntarios sanos durante 1 hora, utilizando PBS 1X y agua como control negativo y positivo, respectivamente.

Los hidrogeles de a base de gelatina 0.75%, Gel y Gel Kol, no causaron liberación de la hemoglobina, mientras que los que tenían ALA 0.5, 1 y 5 mM tuvieron un 0.14%, 0.15% y 0.36% de hemólisis, respectivamente (**Figura 24**).

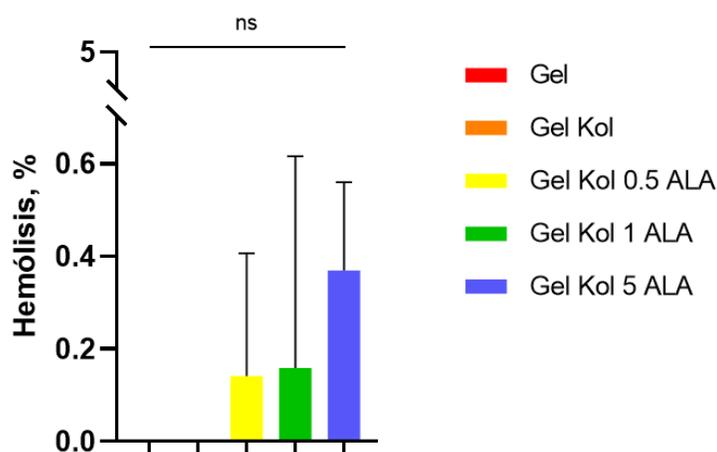


Figura 24. Porcentaje de hemólisis de hidrogeles implantables. Los hidrogeles a base de gelatina 0.75% (Gel), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y con ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), 5 mM (5 ALA) presentaron liberación de la hemoglobina por debajo del 1%. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). La comparación múltiple entre los grupos no fue estadísticamente significativa (ns).

Los hidrogeles a base de alginato dialdehído 5% con gelatina 1%, ADA5G10 tuvieron un 0.58% de hemólisis, con Kol tuvieron 3.22%, y con ALA 0.5, 1 y 5 mM tuvieron 2.51%, 1.32%, 3.31% de hemólisis. Por lo que los hidrogeles son biocompatibles en términos de hemólisis (**Figura 25**).

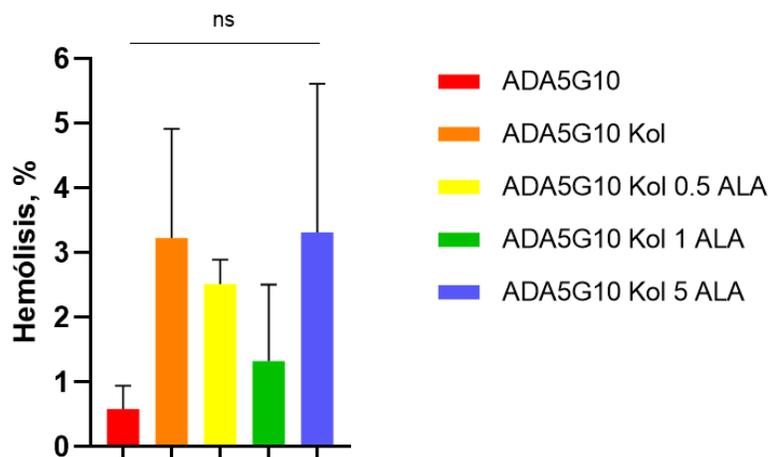


Figura 25. Porcentaje de hemólisis de hidrogeles inyectables. Los hidrogeles a base de alginato dialdehído 5% gelatina 10% (ADA5G10), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y con ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA), presentaron liberación de la hemoglobina por debajo del 5%. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). La comparación múltiple entre los grupos no fue estadísticamente significativa (ns).

3.3.5 Citocompatibilidad

Para determinar la biocompatibilidad de los hidrogeles implantables con células óseas, se realizó mediante ensayo de MTT, el cual es transformado por deshidrogenasas mitocondriales en células vivas en un precipitado de formazán de color azul-magenta. La absorción de formazán disuelto, permite correlacionar la densidad óptica con el número de células vivas intactas (Kumar et al., 2018).

Se sembró una densidad de 350,000 células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 en cada hidrogel a base de gelatina 0.75%. Se incubaron durante 24 y 120 h, cuando se adicionó MTT. La viabilidad celular disminuyó significativamente a las 24 h en las formulaciones Gel a un 41.7%; Gel Kol, a 21.8%; ALA 0.5 mM, un 21.6%, ALA 1 mM 21.1%; y ALA 5mM, 26.2%; en comparación con la monocapa. A las 120 h de cultivo, la viabilidad celular aumentó significativamente entre cada formulación, 68.2%, 48.3%, 44.7%, 37% y 33.1%, respectivamente. Mientras que cuando se comparan con la monocapa, la viabilidad celular sigue estando por debajo de esta, de manera significativa (**Figura 26**).

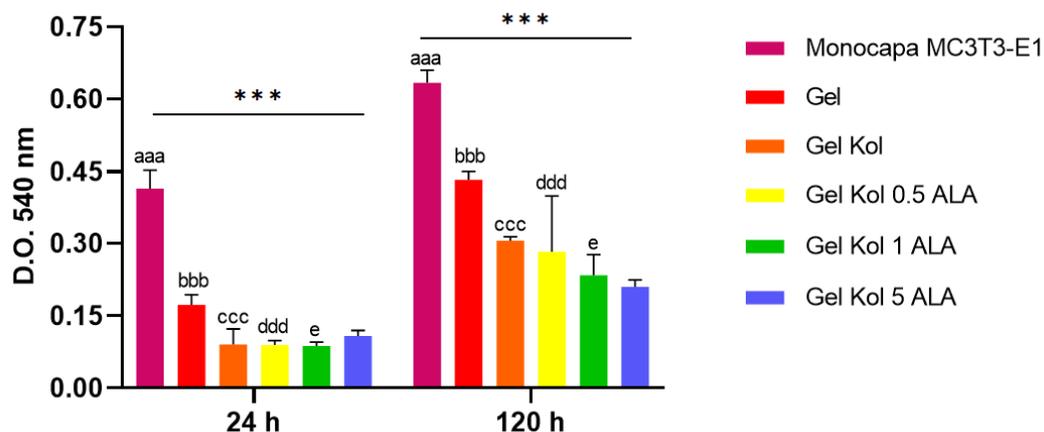


Figura 26. Viabilidad de células MC3T3-E1 cultivadas con hidrogeles implantables. Efecto del cultivo de los hidrogeles a base de gelatina 0.75% (Gel), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y con ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), y 5 mM (5 ALA) en la viabilidad celular a las 24 y 120 h de incubación. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3, por grupo). Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos por $p < 0.05$, donde un valor de 0.12 es considerado no significativo, 0.033 (* o una letra), 0.002 (** o dos letras), y < 0.001 (***) o tres letras).

Para evaluar la compatibilidad de los hidrogeles inyectables con células óseas, se prepararon hidrogeles en placas de 96 pozos, donde células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 fueron cultivadas en las formulaciones de hidrogeles ADA5G10 por 24 h en condiciones estándar. Se preparó un mix de PBS 1X con calceína AM, para determinar la presencia de células vivas (verde), y homodímero de etidio para determinar la presencia de células muertas (rojo). Después de 15 min de incubación, se visualizaron los hidrogeles en microscopio de fluorescencia (EVOS FLoId) (**Figura 27**). En las formulaciones de hidrogeles inyectables a base de ADA5G10 no se detectaron células muertas, y detectamos células viables en las 5 formulaciones de hidrogeles a las 24 h de cultivo.

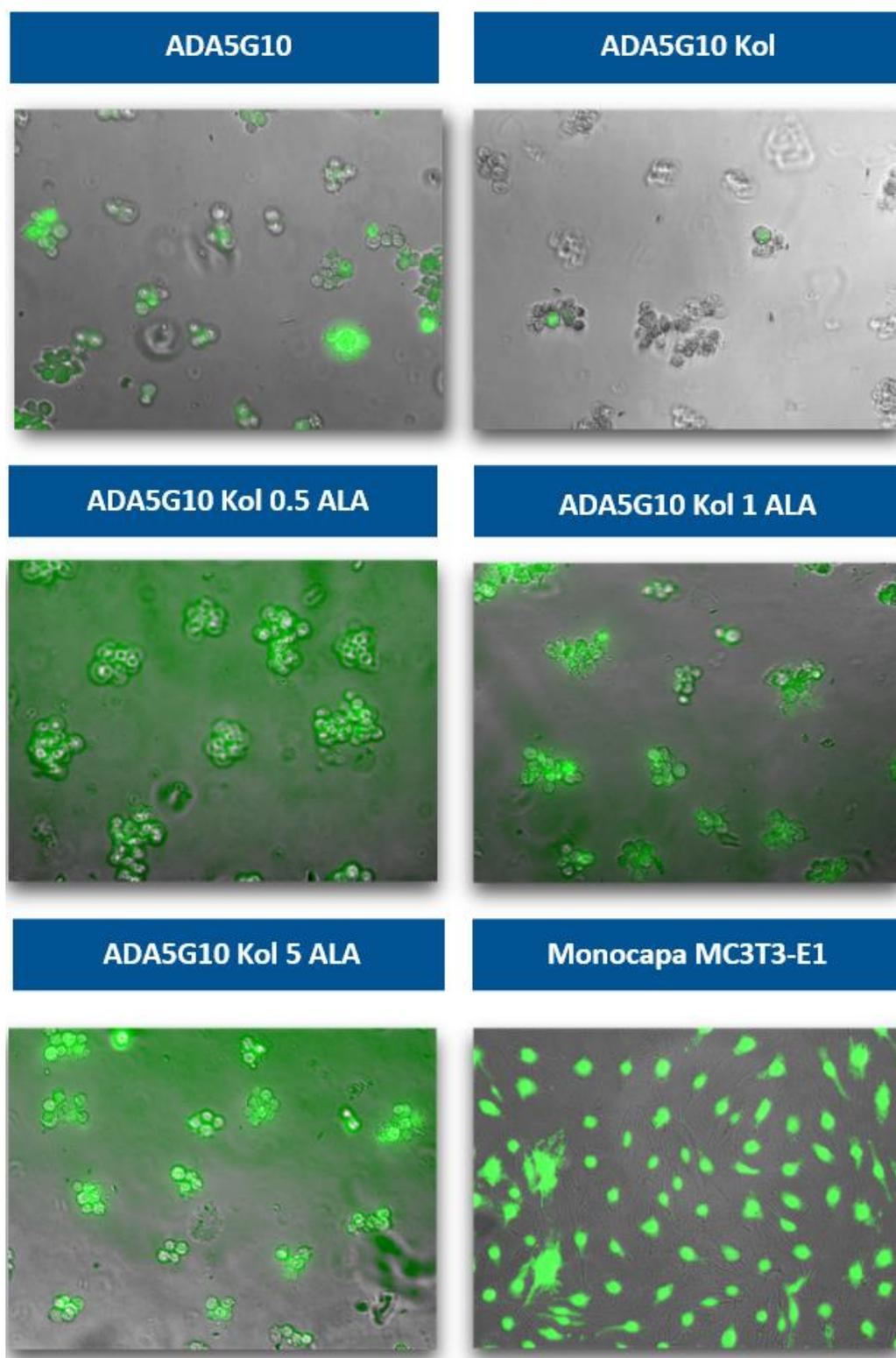


Figura 27. Viabilidad de células MC3T3-E1 cultivadas en hidrogeles inyectables. Determinación de viabilidad celular con kit Live/Dead™ con hidrogeles a base de alginato dialdehído 5% gelatina 10% (ADA5G10), con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol), y ácido α -lipoico 0.5 mM (0.5 ALA), 1 mM (1 ALA), 5 mM (5 ALA) En verde se observan células viables y en rojo células muertas. Objetivo: 20X.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se sintetizaron hidrogeles implantables e inyectables como sistemas de entrega de ácido α -lipoico (ALA), como molécula bioactiva, que posee una naturaleza lipofílica, por lo que no se puede incorporar fácilmente a soluciones acuosas, por lo tanto, se requiere un agente emulsificante que permita solubilizar de manera homogénea en la solución polimérica acuosa. El Kolliphor EL[®] es el estándar industrial surfactante, que actúa como un solubilizador y emulsificante, ampliamente utilizado en la industria farmacéutica. El Kolliphor es elaborado con aceite de castor y óxido de etileno, cuyo componente mayoritario es el polietilén glicol (PEG) ricinoleato (BASF, 2019). Los ésteres de PEG con ácidos grasos forman la parte hidrofóbica, mientras que una pequeña parte de PEG libre y glicerol etoxilado forman la parte hidrofílica, lo que le permite solubilizar moléculas lipofílicas en soluciones acuosas. Por lo tanto, el primer paso de este trabajo, para la síntesis de los hidrogeles, fue encontrar las condiciones para emulsificar el ALA, y que no afectara la viabilidad celular. Los fibroblastos son células clave en la regeneración de tejidos y la respuesta inflamatoria en caso de heridas, ya que son capaces de impulsar la progresión de la reparación tisular hasta tejido completamente funcional o cicatrización, según las señales mecánicas y bioquímicas específicas que se presenten. Por lo tanto, comprender y modular la respuesta fibroblástica a los materiales implantados es fundamental para lograr resultados deseables, como la función del implante a largo plazo o la regeneración tisular (Hannan et al., 2018). Se evaluaron diferentes proporciones de Kolliphor, i.e. el agente emulsificante, con medio de cultivo y en cultivos de fibroblastos de ratón L929 mediante un ensayo colorimétrico de viabilidad celular por MTT. Se determinó que la proporción 0.125:1 de Kolliphor:medio de cultivo no afecta significativamente la viabilidad celular, ya que en comparación con la monocapa de células que no estuvieron en contacto con Kolliphor, hubo un 98% de viabilidad celular. Cuando la proporción de Kolliphor con medio de cultivo incrementó a partir de 0.25:1 hasta 1:1, la viabilidad celular se redujo significativamente. El PEG, el aceite de castor y el óxido de etileno, poseen actividad antioxidante (Iqbal et al., 2012; Juárez-Moreno et al., 2015; Pomierny et al., 2014), son capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno y remover óxido nítrico. Sin embargo, las moléculas antioxidantes en altas concentraciones adquieren una capacidad pro-oxidante lo que tiene un efecto citotóxico en las células, causando peroxidación de lípidos (Bast y Haenen, 2013). La disminución de la viabilidad celular con el incremento de la proporción de Kolliphor, podría deberse al exceso de capacidad antioxidante de los componentes principales de este agente emulsificante. Una vez determinada la proporción de emulsificante, el siguiente paso para establecer las condiciones de síntesis de los hidrogeles, fue encontrar la concentración de ALA que se podía emulsificar y no afectara la viabilidad de los fibroblastos L929. Se evaluó la viabilidad celular con fibroblastos L929 cultivados en los hidrogeles

implantables a base de gelatina 0.75% (Gel) con Kolliphor:Etanol 0.125:1 (Kol) con las concentraciones 0.5, 1, 5, y 10 mM de ALA. En comparación con la monocapa de células L929, que fueron cultivadas en ausencia del hidrogel, la viabilidad celular no se vio afectada cuando se cultivaron con el hidrogel Gel, Gel Kol y Gel Kol 10 ALA. Cuando se tenía el hidrogel con ALA 0.5, 1 y 5 mM, la viabilidad celular incrementó un 9% en comparación con la viabilidad de la monocapa de células. Por esta razón, seleccionamos estas tres formulaciones con el compuesto bioactivo, para realizar la caracterización fisicoquímica y estructural y las pruebas de actividad antiinflamatoria, antioxidante y biocompatibilidad.

Para conocer la microestructura de la superficie de los hidrogeles, se observaron mediante SEM y microtomografía computarizada. Estos materiales se pretenden utilizar como andamio de células, por lo que su estructura tridimensional es importante para que permita la adhesión y proliferación de células, así como la difusión de nutrientes y desechos celulares (Basu, 2017; O'Brien, 2011). En todos nuestros hidrogeles podemos encontrar superficies porosas, sin embargo, el tamaño y distribución de los poros varía entre las formulaciones. Los hidrogeles a base de Gel 0.75% presentaron poros de 4-220 μm de diámetro, con un promedio de 34.8 μm de diámetro y una porosidad de 49% superior de aquellos que llevaban Kolliphor:Etanol, que tuvieron poros de 4-275 μm de diámetro, con un promedio de 26.3 μm y una porosidad de 31%. Los hidrogeles con ALA 5 mM a base de gelatina, tuvieron una mayor cantidad de poros, en comparación con las otras formulaciones, con poros de 8-280 μm de diámetro, y un tamaño de poro promedio de 31.2 μm , y porcentaje de porosidad (26%). El tamaño adecuado para andamios dependerá del tipo de célula y tejido en el que se va a implantar. Para que los materiales sean osteoconductores se espera tener poros de 110-309 μm (Hatton et al., 2019), sin embargo en hidrogeles inyectables se han obtenido buenos resultados de osteoconducción desde diámetros de poro de 36-60 μm (Resmi et al., 2020). La distribución de poros en los hidrogeles implantables a base de gelatina aumentó mientras que la porosidad disminuyó, al adicionar componentes al sistema polimérico, lo que puede atribuirse a la incorporación de Kolliphor, el cual tiene polietilenglicol (PEG), polímero sintético que contribuye a la plastificación de los materiales, y podría estar afectando el entrecruzamiento de la matriz polimérica, aumentando el número de interconexiones, por lo tanto, el número de poros.

El grado de entrecruzamiento del hidrogel ADA5G10 fue el menor con 41.7%, seguido por ADA5G10 Kol con 57% y ADA5G10 Kol 5 ALA 58%. En relación con las reconstrucciones por tomografía computarizada, el número de interacciones de la red polimérica parece disminuir y el tamaño de los poros aumenta, a media que aumenta el grado de entrecruzamiento. Los valores de entrecruzamiento más altos fueron obtenidos con los hidrogeles con ALA 0.5 mM, 72.7% y ALA 1 mM 65.3%. Por lo que el incremento de la concentración de ALA reduce el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles. El grado de

entrecruzamiento obtenido del hidrogel ADA5G10, concuerda a lo que reportado con hidrogeles con concentraciones de alginato dialdehído 15% con gelatina 15% ($43\pm 2\%$), donde a menor concentración de polímeros, un menor grado de entrecruzamiento (Resmi et al., 2020).

Además de tener una microestructura porosa, los hidrogeles deben tener una tasa elevada de absorción de agua para ser hidrofílicos y contribuir a la proliferación celular (Depan et al., 2011). Los hidrogeles de gelatina 0.75% con menos poros, de mayor tamaño y mayor porosidad, demostraron tener una capacidad menor de absorción de PBS 1X en comparación de que aquellos que tenían Kolliphor:Etanol 0.125:1 y ALA, que tenían menor porosidad pero mayor número de poros, con menor tamaño, y entre estos, se mantuvieron con valores similares después de 90 min. La presencia de PEG del Kolliphor podría contribuir al aumento de hidrofiliidad, además de que los poros más pequeños que los hidrogeles de Gel 0.75%, podrían estar reteniendo el líquido. El grado de entrecruzamiento de los hidrogeles a base de alginato dialdehído con gelatina no afectó la capacidad de absorción de PBS 1X, las 5 formulaciones tienen una capacidad máxima de absorción con valores mayores a los reportados por Resmi et al., 2020, ($\sim 600\%$).

Tras haber establecido las condiciones de síntesis de los hidrogeles y haber caracterizado estructural y fisicoquímicamente, es necesario determinar si el compuesto bioactivo, el ALA, aún mantiene sus propiedades biológicas, para esto se evaluó la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de las cinco formulaciones de los hidrogeles implantables e inyectables. La capacidad antiinflamatoria evaluada en términos de remoción de óxido nítrico (NO), donado por el nitroprusiato de sodio, el cual es un mediador proinflamatorio quimioatrayente de células del sistema inmunológico, que en altas concentraciones durante un tiempo prologando, retrasa el proceso de síntesis de matriz extracelular, por lo tanto, retrasa el proceso de regeneración (Sharma et al., 2007). El porcentaje de NO se determinó con el reactivo de Griess, el cual detecta la cantidad de nitritos. El nitrito puede ser cuantificado mediante colorimetría, donde la absorbancia a 540 nm disminuye si hay una alta remoción de NO. Los hidrogeles a base de Gel 0.75%, no poseen actividad antiinflamatoria, mientras que cuando se adiciona Kol, tiene un 29.6% de capacidad de remoción de NO, ya que el PEG y ricinoleato, poseen actividad antiinflamatoria (Ackland et al., 2010; Iqbal et al., 2012). Aquellas formulaciones con ALA, disminuyeron su capacidad de remoción de NO en comparación con aquella que no tenía, y se mantuvieron por debajo del 25%, por lo que el efecto del ALA no aumenta la capacidad de remoción de NO. Las cinco formulaciones de hidrogeles inyectables ADA5G10, alcanzaron valores por encima de 80%, y esta aumentó conforme aumentaba la concentración del ALA hasta un 96%, por lo que estos hidrogeles podrían reducir la inflamación en la regeneración ósea, al disminuir la infiltración de neutrófilos y la producción de citocinas proinflamatorias, lo que contribuiría a la disminución de actividad osteoclástica (Kim et al., 2006; Mountziaris y Mikos, 2008).

La capacidad antioxidante evaluada en términos de inhibición de la oxidación del radical ABTS^{•+}. Aunque la presencia de especies oxidantes en el proceso inflamatorio es necesario para la señalización celular, la alta concentración de especies oxidantes y la baja concentración de antioxidantes tras un traumatismo, produce un daño tisular que retrasa el proceso de regeneración, debido a la muerte celular de osteocitos y activación de osteoclastos (Domazetovic et al., 2017). La adición de compuestos antioxidantes a la solución de ABTS^{•+}, produce una decoloración la cual puede ser cuantificada por absorbancia, que se traduce en el porcentaje de inhibición de la oxidación. Los valores de los hidrogeles implantables a base de gelatina 0.75% se mantuvieron similares entre sí, sin significancia estadística, alrededor de un 53% de inhibición de la oxidación, y esta aumentó conforme aumentó la concentración de ALA hasta un 62.2%. Los hidrogeles inyectables a base de alginato dialdehído y gelatina, inhibieron de igual manera un 100%. La capacidad antioxidante de nuestras formulaciones de hidrogeles podrían contribuir a la disminución de activación de osteoclastos, y promover la sobrevivencia de osteocitos, así como la formación de osteoblastos, debido a la liberación de ácido lipoico (Agidigbi y Kim, 2019; Roberts y Moreau, 2015).

La biocompatibilidad de los hidrogeles implantables e inyectables se evaluó con respecto a su hemocompatibilidad y viabilidad celular. En la sangre se encuentran poblaciones celulares de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Los eritrocitos son las células más rígidas en la sangre, por lo tanto, las más sensibles de sufrir lisis celular por el estrés y cambios en la presión osmótica (Weber et al., 2018). El ensayo de hemólisis es considerado como una prueba confiable para estimar la biocompatibilidad sanguínea de los materiales, ya que la relación hemolítica refleja la fuerza de interacción entre el material y las células sanguíneas (Ooi et al., 2019), un porcentaje por debajo del 5% se considera como altamente biocompatible. Según la ISO 10993-4, la prueba de hemocompatibilidad es uno de los criterios más importantes para garantizar el éxito de la aplicabilidad *in vivo*. Las cinco formulaciones de hidrogeles implantables a base de gelatina 0.75% mantuvieron un porcentaje de hemólisis por debajo del 0.4%, sin diferencias significativas. Los hidrogeles inyectables a base de alginato dialdehído y gelatina tuvieron un 0.6% de hemólisis, los hidrogeles ADA5G10 Kol y ADA5G10 5 Kol ALA, tuvieron menos de 3.5%. Los hidrogeles ADA5G10 Kol 0.5 ALA tuvo un 2.5% y ADA5G10 Kol 1 ALA un 1.32%. Todos los hidrogeles se mantienen por debajo del 5% de hemólisis, por lo que son materiales seguros en términos de hemólisis.

El siguiente criterio para determinar la biocompatibilidad de los hidrogeles, fue evaluar la viabilidad celular con células óseas, para establecer su potencial aplicación en la regeneración ósea. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y células de ratón pre-osteoblastos MC3T3-E1. Con este ensayo se puede medir la actividad metabólica de las células, al convertir la sal de tetrazolio de MTT a cristales de formazán,

mediante la desprotonación de la enzima NADPH. El incremento o decremento de células viables puede cuantificarse mediante densidad óptica a una absorbancia a 540 nm. La viabilidad de las células L929 cultivadas en los hidrogeles a base de gelatina no se ve afectada, y esta aumenta cuando se tiene ALA 0.5, 1 y 5 mM a un 109%, cuando son evaluados de manera directa. Sin embargo, cuando se evalúa en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1, hay una reducción significativa de la viabilidad celular en comparación con la monocapa a las 24 y 120 h de incubación. La proliferación de los osteoblastos en los hidrogeles aumenta a lo largo del tiempo de manera significativa, de 24 h a 120 h de incubación. Este comportamiento es esperado, debido al tiempo de adaptación de los osteoblastos, a la superficie del material, así como a las propiedades fisicoquímicas de este, lo que retrasa el tiempo de adhesión. La proliferación de MC3T3-E1 se recupera después de 7 días de cultivo y se mantiene hasta el día 10, aumentando la viabilidad celular en comparación con la monocapa (Cui et al., 2020). Los hidrogeles de alginato dialdehído con gelatina, no se pudieron evaluar mediante el método de MTT, ya que pueden formar cristales de formazán sin tener células en cultivo. Para determinar la viabilidad celular de los hidrogeles inyectables se empleó el kit de viabilidad celular Live/Dead™, el cual permite visualizar las células vivas y muertas mediante fluorescencia. Las células vivas metabolizan la calceína mediante las esterasas en el citoplasma, obteniendo así un producto fluorescente verde, mientras que el homodímero de etidio es fluorescente, permea las membranas rotas de las células muertas, obteniendo una fluorescencia roja al unirse con el DNA de las células muertas. Después de 24 h de cultivo en el hidrogel ADA5G10, se detectaron sólo células MC3T3-E1 viables.

Capítulo 5. Conclusiones

Se estableció y estandarizó el protocolo de síntesis de hidrogeles implantables a base de gelatina 0.75% con ácido α -lipoico (ALA), así como el protocolo de síntesis de hidrogeles inyectables a base de alginato dialdehído y gelatina con ácido α -lipoico. Se determinó la proporción de Kolliphor:Etanol para emulsificar el ALA, como aquella que tuviera una alta viabilidad celular.

Los hidrogeles obtenidos poseen una porosidad, que permite la proliferación de células, sin embargo, la distribución y tamaño de los poros cambia al incorporar Kolliphor:Etanol y ácido α -lipoico a los diferentes hidrogeles. En el caso de los que son a base de gelatina 0.75%, el diámetro del poro disminuyó y aumentó la cantidad de poros, al incorporar estos componentes. Mientras que en los hidrogeles inyectables a base de alginato dialdehído con gelatina, el efecto fue contrario, donde el tamaño de los poros aumentó y la cantidad de poros disminuyó.

Ambos tipos de hidrogeles poseen actividad antioxidante, en términos de la inhibición de la oxidación del radical ABTS^{••}, y actividad antiinflamatoria, en términos de remoción de óxido nítrico. Los hidrogeles inyectables a base de alginato dialdehído y gelatina, demostraron tener propiedades superiores a los hidrogeles implantables a base de gelatina, al inhibir por completo la oxidación del ABTS^{••} y remover el óxido nítrico al aumentar la concentración del ácido α -lipoico. Sin embargo, no tenemos evidencia suficiente para decir que uno es mejor que otro en términos de actividad biológica, ya que una elevada actividad antioxidante o antiinflamatoria, podría ser perjudicial para el proceso de regeneración, por lo que se sugiere evaluar la actividad biológica en un modelo de cultivo con agentes oxidantes, como H₂O₂ y agentes pro-inflamatorios, como LPS.

La biocompatibilidad de los hidrogeles se evaluó en términos de hemólisis y viabilidad celular. Los hidrogeles implantables tuvieron un porcentaje de hemólisis por debajo del 0.4% y los hidrogeles inyectables por debajo del 3.5%. Ambos estuvieron por debajo del porcentaje establecido del 5%, en la ISO 10993-4 que determina como materiales altamente biocompatibles.

La viabilidad celular se evaluó con los hidrogeles implantables e inyectables, en cultivo con fibroblastos y pre-osteoblastos. En el caso de los fibroblastos, la viabilidad celular no se vio afectada cuando se cultivaron en los hidrogeles implantables y aumentó cuando se tenía ácido α -lipoico 0.5, 1 y 5 mM en el hidrogel a base de gelatina 0.75%. Las células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas en los hidrogeles implantables a base de gelatina 0.75%, tardaron en adaptarse al medio de cultivo tridimensional. De 24 a

120 h aumentaron significativamente la viabilidad celular entre cada formulación, cuando se incubaron con los hidrogeles a base de gelatina. Estos resultados nos indican que debemos dejar por más días de cultivo hasta 10 días, según lo reportado en la literatura. Los hidrogeles inyectables a base de alginato dialdehído con gelatina, se mantuvieron viables a las 24 h, cuando se evaluó la viabilidad celular con el kit Live/Dead™. Se sugiere realizar las evaluaciones con este kit, en los mismos días que se evaluaron los hidrogeles implantables.

En este trabajo se optimizaron las condiciones de síntesis de hidrogeles, logrando emulsificar el ALA en un sistema de entrega, el cual posee porosidad apropiada para servir como andamio de células, y una capacidad de absorción de agua que podría permitir la difusión de nutrientes y desechos celulares. Estos sistemas de entrega son bioactivos, en términos de actividad antiinflamatoria y antioxidante, y son biocompatibles en términos de hemólisis y viabilidad celular con fibroblastos y células óseas. La bioactividad que les confiere el ALA en las células los convierte en biomateriales potenciales para su aplicación en la regeneración ósea. Para establecer su potencial osteogénico se recomienda realizar ensayos de diferenciación de osteoblastos y osteoclastos en cultivo con los hidrogeles.

Literatura citada

- Ackland, G. L., Gutierrez Del Arroyo, A., Yao, S. T., Stephens, R. C., Dyson, A., Klein, N. J., Singer, M., Gourine, A. V. 2010. Low-molecular-weight polyethylene glycol improves survival in experimental sepsis. *Critical Care Medicine*, 38(2), 629–636.
- Agidigbi, T. S., Kim, C. 2019. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 1–16.
- Ahmed, E. M. 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121.
- Augst, A. D., Kong, H. J., Mooney, D. J. 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(8), 623–633.
- Aydin, A., Halici, Z., Akoz, A., Karaman, A., Ferah, I., Bayir, Y., Aksakal, A. M., Akpınar, E., Selli, J., Kovaci, H. 2014. Treatment with α -lipoic acid enhances the bone healing after femoral fracture model of rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(11), 1025–1036.
- Baek, K. H., Oh, K. W., Lee, W. Y., Lee, S. S., Kim, M. K., Kwon, H. S., Rhee, E. J., Han, J. H., Song, K. H., Cha, B. Y., Lee, K. W., Kang, M. Il. 2010. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcified tissue international*, 87(3), 226–235.
- Bai, X., Gao, M., Syed, S., Zhuang, J., Xu, X., Zhang, X.-Q. 2018. Bioactive hydrogels for bone regeneration. *Bioactive Materials*, 3(4), 401–417.
- Balakrishnan, B., Jayakrishnan, A. 2005. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, 26(18), 3941–3951.
- Barros, J., Ferraz, M. P., Azeredo, J., Fernandes, M. H., Gomes, P. S., Monteiro, F. J. 2019. Alginate-nanohydroxyapatite hydrogel system: Optimizing the formulation for enhanced bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 105, 109985.
- BASF. 2019. Kolliphor[®] EL. Technical information, 03_111139e-04, 1-5. Recuperado el 19 de junio del 2020, de <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-el>
- Bast, A., Haenen, G. R. M. M. 2013. Ten misconceptions about antioxidants. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(8), 430–436.
- Basu, B. 2017. Biomaterials for Musculoskeletal Regeneration. En Springer Nature. pp. 33-40.
- Bonucci, E. 2012. Bone mineralization. *Frontiers in Bioscience*, 17(1), 100–128.

- Byun, C.-H., Koh, J.-M., Kim, D. K., Park, S.-I., Lee, K.-U., Kim, G. S. 2005. α -Lipoic acid inhibits TNF- α -induced apoptosis in human bone marrow stromal. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(7), 1125–1135.
- Caló, E., Khutoryanskiy, V. V. 2015. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252–267.
- CENATRA Centro Nacional de Trasplantes. 2019. Boletín estadístico informativo. pp. 4–71. Recuperado el 24 de octubre del 2020, de <https://www.gob.mx/cenatra/documentos/boletin-estadistico-informativo>
- Cui, N., Han, K., Li, M., Wang, J., Qian, J. 2020. Pure polylysine-based foamy scaffolds and their interaction with MC3T3-E1 cells and osteogenesis. *Biomedical Materials (Bristol)*, 15(2).
- Depan, D., Girase, B., Shah, J. S., Misra, R. D. K. 2011. Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 7(9), 3432–3445.
- Domazetovic, V., Marcucci, G., Iantomasi, T., Brandi, M. L., Vincenzini, M. T. 2017. Oxidative stress in bone remodeling: Role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 14(2), 209–216.
- Elgali, I., Omar, O., Dahlin, C., Thomsen, P. 2017. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *European Journal of Oral Sciences*, 125(5), 315–337.
- Fontani, F., Marcucci, G., Iantomasi, T., Brandi, M. L., Vincenzini, M. T. 2015. Glutathione, N-acetylcysteine and lipoic acid down-regulate starvation-induced apoptosis, RANKL/OPG ratio and sclerostin in osteocytes: Involvement of JNK and ERK1/2 signalling. *Calcified Tissue International*, 1–12.
- Fu, C., Xu, D., Wang, C.-Y., Jin, Y., Liu, Q., Meng, Q., Liu, K.-X., Sun, H.-J., Liu, M.-Z. 2015. α -Lipoic acid promotes osteoblastic formation in H₂O₂-treated MC3T3-E1 cells and prevents bone loss in ovariectomized rats. *Journal of Cellular Physiology*, (230), 2184–2202.
- Fuchs, R. K., Warden, S. J., Turner, C. H. 2009. Bone anatomy, physiology and adaptation to mechanical loading. En *Bone Repair Biomaterials*. pp. 25-68.
- Goraca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., Skibska, B. 2011. Lipoic acid-biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*, 63, 849–858.
- Gothard, D., Smith, E. L., Kanczler, J. M., Black, C. R., Wells, J. A., Roberts, C. A., White, L. J., Qutachi, O., Peto, H., Rashidi, H., Rojo, L., Stevens, M. M., El Haj, A. J., Rose, F. A. R. J., Shakesheff, K. M., Oreffo, R. O. C. 2015. In vivo assessment of bone regeneration in alginate/bone ECM hydrogels with incorporated skeletal stem cells and single growth factors. *PLoS ONE*, 10(12), 1–23.
- Ha, H., Lee, J., Kim, H., Kim, H., Kwak, H. B., Lee, S., Kim, H., Lee, H., Ha, H., Lee, J., Kim, H., Kim, H., Kwak, H. B., Lee, S., Kim, H., Lee, Z. H. 2020. α -Lipoic acid inhibits inflammatory bone resorption by suppressing prostaglandin E₂ synthesis. *The Journal of Immunology*, 176, 111–117.

- Hannan, R. T., Peirce, S. M., Barker, T. H. 2018. Fibroblasts: Diverse cells critical to biomaterials integration. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(4), 1223–1232.
- Hatton, J., Davis, G. R., Mourad, A. H. I., Cherupurakal, N., Hill, R. G., Mohsin, S. 2019. Fabrication of porous bone scaffolds using alginate and bioactive glass. *Journal of Functional Biomaterials*, 10(15), 1-14.
- Hernández-González, A. C., Téllez-Jurado, L., Rodríguez-Lorenzo, L. M. 2019. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A Review. *Carbohydrate Polymers*, 229(115514), 1-22.
- Hutchings, G., Moncrieff, L., Dompe, C., Janowicz, K., Sibiak, R., Bryja, A., Jankowski, M., Mozdziak, P., Bukowska, D., Antosik, P., Shibli, J. A., Dyszkiewicz-Konwińska, M., Bruska, M., Kempisty, B., Piotrowska-Kempisty, H. 2020. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells; from basic knowledge, animal models to clinical trials. *Journal of Clinical Medicine*, 9(139), 1-27.
- Iqbal, J., Zaib, S., Farooq, U., Khan, A., Bibi, I., Suleman, S. 2012. Antioxidant, antimicrobial, and free radical scavenging potential of aerial parts of *Periploca aphylla* and *Ricinus communis*. *International Scholarly Research Network ISRN Pharmacology*, 2012(563267), 1-6.
- Juarez-Moreno, K., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R. 2015. Antioxidant capacity of Poly(Ethylene Glycol) (PEG) as protection mechanism against hydrogen peroxide inactivation of peroxidases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(6), 1364–1373.
- Kim, H. J., Chang, E. J., Kim, H. M., Lee, S. B., Kim, H. D., Su Kim, G., Kim, H. H. 2006. Antioxidant α -lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor- κ B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and tumor necrosis factor- α . *Free Radical Biology and Medicine*, 40(9), 1483–1493.
- Koh, J.-M., Lee, Y.-S., Byun, C.-H., Chang, E.-J., Kim, H., Kim, Y. H., Kim, H.-H., Kim, G. S., Division. 2005. α -Lipoic acid suppresses osteoclastogenesis despite increasing the receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin ratio in human bone marrow stromal cells. *Journal of Endocrinology*, 185, 401–413.
- Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P. D. 2018. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471.
- Lee, K. Y., Mooney, D. J. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126.
- Lee, S. H., Kim, M. J., Kim, B. J., Kim, S. R., Chun, S., Ryu, J. S., Kim, G. S., Lee, M. C., Koh, J. M., Chung, S. J. 2010. Homocysteine-lowering therapy or antioxidant therapy for bone loss in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 25(3), 332–340.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Martin, K. C. 2016. *Molecular Cell Biology*. En W.H. Freeman and Company. pp. 509-510.

- Lovato-Salas, F., Luna-Pizarro, D., Oliva-Ramírez, S. A., Flores-Lujano, J., Núñez-Enríquez, J. C. 2015. Prevalencia de fracturas de cadera, fémur y rodilla en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Traumatología y Ortopedia "Lomas Verdes" del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Acta ortopédica mexicana*, 29(1), 13–20.
- Mainini, G., Rotondi, M., DiNola, K., Pezzella, M. T., Iervolino, S. A., Seguino, E., D'Eufemia, D., Iannicelli, I., Torella, M. 2012. Oral supplementation with antioxidant agents containing alpha lipoic acid: effects on postmenopausal bone mass. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*, 39(4), 489–493.
- Majidinia, M., Sadeghpour, A., Yousefi, B. 2018. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 2937–2948.
- Marsell, R., Einhorn, T. A. 2011. The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551–555.
- Mountziaris, P. M., Mikos, A. G. 2008. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 14(2), 179–186.
- Ning, Z., Tan, B., Chen, B., Lau, D. S. A., Wong, T. M., Sun, T., Peng, S., Li, Z., Lu, W. W. 2019. Precisely controlled delivery of abaloparatide through injectable hydrogel to promote bone regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 19(6), 1–9.
- O'Brien, F. J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95.
- Ooi, C. H., Ling, Y. P., Abdullah, W. Z., Mustafa, A. Z., Pung, S. Y., Yeoh, F. Y. 2019. Physicochemical evaluation and in vitro hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(44), 1-10.
- Pomierny, B., Krzyżanowska, W., Smaga, I., Pomierny-Chamioło, L., Stankowicz, P., Budziszewska, B. 2014. Ethylene glycol ethers induce oxidative stress in the rat brain. *Neurotoxicity Research*, 26(4), 422–429.
- Raggatt, L. J., Partridge, N. C. 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103–25108.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, 2014(761264), 1-19.
- Ralston, S. H. 2017. Bone structure and metabolism. *Medicine*, 45(9), 560-564.
- Resmi, R., Parvathy, J., John, A., Joseph, R. 2020. Injectable self-crosslinking hydrogels for meniscal repair: A study with oxidized alginate and gelatin. *Carbohydrate Polymers*, 234(115902), 1-11.
- Roberts, J. L., Moreau, R. 2015. Emerging role of alpha-lipoic acid in the prevention and treatment of bone loss. *Nutrition Reviews*, 73(2), 116–125.

- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C. 2019. Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 206(3918), 455–467.
- Segredo-Morales, E., García-García, P., Reyes, R., Pérez-Herrero, E., Delgado, A., Évora, C. 2018. Bone regeneration in osteoporosis by delivery BMP-2 and PRGF from tetronic–alginate composite thermogel. *International Journal of Pharmaceutics*, 543(1–2), 160–168.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., Parvathy, S. S. 2007, diciembre 31. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259.
- Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Hagen, T. M. 2008. Is α -lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life*, 60(6), 362–367.
- Stevens, M. M. 2008. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, 11(5), 18–25.
- Tortora, G. J., Derrickson, B. 2017. Capítulo 6. Sistema esquelético: Tejido óseo. En *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana. pp. 171–193.
- Uhrich, K. E., Abdelhamid, D. 2016. Biodegradable and bioerodible polymers for medical applications. *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*, 63–83.
- Viveros, J., Torres, J., Alarcón, T., Condorhuamán, P., Sánchez, C., Gil, E., González, J. 2018. Fractura de cadera por fragilidad en México: ¿En dónde estamos hoy? ¿Hacia dónde queremos ir? *Acta Ortopédica Mexicana*, 32(6), 334–341.
- Weber, M., Steinle, H., Golombek, S., Hann, L., Schlensak, C., Wendel, H. P., Avci-Adali, M. 2018. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(99), 1–14.
- Williams, D. F. 2009. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30(30), 5897–5909.
- Wong, R., Espinoza, M., Palloni, A. 2007. Mexican older adults with a wide socioeconomic perspective: Health and aging. *Salud Publica de Mexico*, 49(4), S436-S447.
- Yang, T., Xie, P., Wu, Z., Liao, Y., Chen, W., Hao, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Teng, W. 2020. The Injectable Woven Bone-Like Hydrogel to Perform Alveolar Ridge Preservation With Adapted Remodeling Performance After Tooth Extraction. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(119), 1–15.
- Yuanhao, Z., Mingjiao, C., Jia, T., Ping, G., Cao, H., Fan, X., Zhang, W. 2019. In situ bone regeneration enabled by a biodegradable hybrid double-network hydrogel. *Biomaterials Science*, 7(8), 3266–3276.
- Zárate-Kalfópulos, B., Reyes-Sánchez, A. 2006. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cirugía y cirujanos*, 74(3), 217–222.

Zhang, Z.-Z., Song, L., Zhang, Z.-Y., Lv, M.-M. 2017. Control-released alpha-lipoic acid-loaded PLGA microspheres enhance bone formation in type 2 diabetic rat model. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(9), 10019–10031.