

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS ENCAPSULADAS EN  
HIDROGELES DE POLIETILENGLICOL EN PRESENCIA DE DIFERENTES  
POLISACÁRIDOS, CON FINES DE RECONSTRUCCIÓN DE TEJIDOS**

**DIANA ROCIO ORTIZ RODRIGUEZ  
LEIDY MARCELA GELVES JEREZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2007**

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS ENCAPSULADAS EN  
HIDROGELES DE POLIETILENGLICOL EN PRESENCIA DE DIFERENTES  
POLISACÁRIDOS, CON FINES DE RECONSTRUCCIÓN DE TEJIDOS**

**DIANA ROCIO ORTIZ RODRIGUEZ  
LEIDY MARCELA GELVES JEREZ**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de:  
Ingeniero Químico.**

**Directora:  
PhD. MARIAH HAHN**

**Lector:  
PhD. DIONISIO LA VERDE**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2007**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al alcanzar esta meta de nuestras vidas queremos agradecerles a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron para que fuese posible.

A la Universidad Industrial de Santander le agradecemos por la oportunidad de formación que nos brindó no solo como Ingenieras Químicas sino como personas valiosas para la sociedad a la cual debemos retribuir y servir desde cualquiera que sea nuestro ejercicio profesional.

A nuestra directora de proyecto la Dra. Mariah Hahn, a la universidad de Texas A&M, al Ingeniero Dany Jair Muñoz Pinto, al Dr. Dionisio Laverde Catano, Lector, por aportarnos conocimientos que nos fueron indispensables para el éxito de nuestro trabajo de grado y también al Dr. Álvaro Ramírez García por haber compartido esta primera experiencia profesional con la cual se pusieron en practica las enseñanzas que adquirimos en el desarrollo del plan académico.

Un especial agradecimiento a nuestros amigos por compañía y enseñanzas a lo largo de la carrera.

Dedicado a Dios por darme una madre irremplazable que ha dado todo en su vida para que mis metas sean alcanzadas, Marina Jerez, a mi tía Ana María Gelvez, por ser la propulsora de mi desarrollo profesional y a mi núcleo familiar por darme un motivo por el cual salir adelante.

Marcela Gelvez

A mi madre, Lucila Rodríguez, por su amparo ilimitado, por sus enseñanzas que han hecho de mí una mujer íntegra, a Dios que desde el cielo junto con mi Padre han sido mis guías espirituales a lo largo de mi vida, a mis hermanos que siempre me brindaron todo su apoyo y a mi familia en general por estar siempre dispuestos con su amor.

Diana Ortiz

## TABLA DE CONTENIDO

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>I MARCO TEORICO</u></b> .....	<b>3</b>
<u>1.1.INGENIERÍA DE TEJIDOS</u> .....	<u>3</u>
<u>1.2.CÉLULAS UTILIZADAS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS</u> .....	<u>5</u>
<u>1.2.1.CÉLULAS DIFERENCIADAS</u> .....	<u>5</u>
<u>1.2.1.1.FIBROBLASTOS DE CUERDAS VOCALES (FCV)</u> .....	<u>6</u>
<u>1.2.1.2.CÉLULAS DE MUSCULO LISO ARTERIAL (CMLA)</u> .....	<u>7</u>
<u>1.3.ESTRUCTURA DE SOPORTE</u> .....	<u>7</u>
<u>1.3.1.MATERIALES PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL SOPORTE</u> .....	<u>9</u>
<u>1.3.1.1.POLIETILENGLICOL DIACRILADO (PEGDA)</u> .....	<u>9</u>
<u>1.3.1.2.ALGINATO (AA)</u> .....	<u>10</u>
<u>1.3.1.3.ÁCIDO HIALURÓNICO (AH)</u> .....	<u>11</u>
<u>1.3.1.4.SULFATO DE CONDROITINA (O CONDROITIN SULFATO CS)</u> .....	<u>12</u>
<u>1.3.1.5.DERMATAN SULFATO (DS)</u> .....	<u>12</u>
<u>1.3.1.6.HEPARIN SULFATO (HS)</u> .....	<u>13</u>
<b><u>II DESARROLLO EXPERIMENTAL</u></b> .....	<b>14</b>
<u>2.1. SINTESIS DE LOS POLISACARIDOS</u> .....	<u>14</u>
<u>2.2. MANTENIMIENTO CELULAR</u> .....	<u>14</u>
<u>2.3.ENCAPSULACIÓN CELULAR Y CULTIVO</u> .....	<u>15</u>
<u>2.4.ANÁLISIS BIOQUÍMICOS</u> .....	<u>16</u>

2.4.1. NÚMERO DE CÉLULAS.....	16
2.4.2. COLÁGENO.....	17
2.4.3. ELASTINA.....	18
2.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.....	19
2.6. PRUEBAS MECÁNICAS.....	20
<b>III RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS.....	21
3.1.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS.....	21
3.1.2. CANTIDAD DE COLÁGENO PRODUCIDO POR CÉLULA.....	23
3.1.3. CANTIDAD DE ELASTINA PRODUCIDA POR CÉLULA.....	24
3.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.....	25
3.2.1. DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	25
3.2.2. COLÁGENO TIPO I.....	27
3.1.3. ELASTINA.....	29
3.3. PRUEBAS MECÁNICAS.....	31
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO I REACTIVOS PREPARADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO II IMÁGENES DE APOYO.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enfoques de la Ingeniería de Tejidos.	4
Figura 2. Anatomía de Las Cuerdas Vocales Humanas.	6
Figura 3. Anatomía de las Arterias Humanas.	7
Figura 4. Reacción de Diacrilación del PEG y esquematización de la adición de RGD.	10
Figura 5. Monómero de Alginato.	11
Figura 6. Monómero de Acido Hialurónico.	11
Figura 7. Monómero de Sulfato de Condroitina.	12
Figura 8. Monómero de Dermatan Sulfato.	13
Figura 9. Monómero de Heparin Sulfato.	13
Figura 10. Densidad Celular vs Tiempo para los Fibroblastos, Alginato (AA), Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM), Ácido hialurónico de alto peso molecular (AH-APM).	21
Figura 11. Densidad Celular vs Tiempo para las Células de musculo liso arterial, Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM), Condroitin sulfato (CS), Heparin sulfato (HS) y Dermatan sulfato (DS).	22
Figura 12. $\mu\text{g}$ de Colágeno producido por las Fibroblastos durante el tiempo de cultivo, Alginato (AA), Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM), Ácido hialurónico de alto peso molecular (AH-APM).	23
Figura 13. $\mu\text{g}$ de Colágeno producido por las Células de musculo liso arterial durante el tiempo de cultivo, Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM), Condroitin sulfato (CS), Heparin sulfato (HS) y Dermatan sulfato (DS).	24
Figura 14. $\mu\text{g}$ de Elastina producida por los Fibroblastos durante el tiempo de cultivo, Alginato (AA), Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM), Ácido hialurónico de alto peso molecular (AH-APM).	25

- Figura 15. Imagen tomada con Microscopio Axiovert 200 M (objetivo 20x) para análisis histológicos de tinción con Vimentin ácido hialuronico de bajo peso molecular, tiempo 35 días para los Fibroblastos. 26
- Figura 16. Imagen tomada con Microscopio Axiovert 200 M (objetivo 20x) para análisis histológicos de diferenciación de las células de musculo liso arterial a los 35 días de cultivo a.) MHC para hidrogeles con ácido hialuronico de bajo peso molecular y b.) Actin para hidrogeles con Dermatan sulfato. 27
- Figura 17. Imágenes correspondientes a los resultados de los análisis histológicos de colágeno tipo I para la tercera semana de los hidrogeles que contenían los fibroblastos. a) Alginato y b.) Ácido hialuronico de bajo peso molecular. 28
- Figura 18. Imágenes correspondientes a los resultados de los análisis histológicos de colágeno tipo I para las Células de musculo liso arterial a las dos semanas de cultivo. a) hidrogeles con ácido hialuronico de bajo peso molecular y b.) Hidrogeles con Heparin sulfato. 28
- Figura 19. Imágenes correspondientes a los resultados de los análisis histológicos de Elastina para las Células de musculo liso arterial. a) Condroitin sulfato a 35 días, b.) Ácido hialuronico de bajo peso molecular a 35 días, c.) Dermatan sulfato a 35 días, d.) Condroitin sulfato a 14 días, e.) Heparin sulfato a 14 días y f.) Dermatan sulfato a 14 días. 29
- Figura 20. Porcentaje de células marcadas positivas para los análisis histológicos de elastina para las Células de musculo liso arterial durante el tiempo de cultivo, Ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM), Condroitin sulfato (CS), Heparin sulfato (HS) y Dermatan sulfato (DS). 30
- Figura 21. Cálculo del Módulo de Young por regresión lineal de la curva Esfuerzo vs Deformación del hidrogel de ácido hialuronico de bajo peso molecular que contenía fibroblastos. 31
- Figura 22. Comparación del Modulo de Young contra el Tiempo para los Hidrogeles que contenían los fibroblastos, Alginato (AA), Ácido hialuronico de bajo

peso molecular (AH-BPM), Ácido hialurónico de alto peso molecular (AH-APM). 32

Figura 23. Comparación del Modulo de Young contra el Tiempo para los Hidrogeles que contenían las Células de músculo liso arterial, Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM), Condroitin sulfato (CS), Heparin sulfato (HS) y Dermatan sulfato (DS). 33

## **GLOSARIO**

**AGAROSA.** Es un producto natural que forma una matriz inerte y no tóxica que supone una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de Biología Molecular, Bioquímica y Biología Celular.

**ALLOGENICA.** Células provenientes de un donador humano quien no es inmunológicamente idéntico al paciente.

**ANGIOGENESIS.** Es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes. La angiogénesis es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas.

**AUTOLOGOS.** En biología se refiere a células, tejidos o también proteínas que son reimplantadas en el mismo individuo de donde provienen.

**BIOCOMPATIBILIDAD.** Es la capacidad del biomaterial o equipo medico implantable de ser tolerado por el organismo o aceptado por el tejido biológico que lo va a rodear una vez instalado.

**BIOFUNCIONALIDAD.** Es la capacidad del biomaterial o equipo medico implantable para cumplir con las funciones para las cuales fue diseñado.

**CÉLULA ENDOTELIAL.** Es un tipo de célula aplanada que recubre el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los capilares, formando parte de su pared.

**CÉLULAS POLIFUNCIONALES.** Son células primordiales encontradas en todos los organismos pluricelulares. Estas células tienen la habilidad de renovarse por si

mismas por mitosis y pueden diferenciarse en un diverso rango de tipos de células especializadas.

**COLÁGENO.** El colágeno es un material extracelular fabricado por las células. Es una proteína fibrosa que resulta relativamente insoluble en agua. La base molecular del colágeno está constituida por cadenas de poli-péptidos y cada uno de éstos es un polímero de aminoácidos.

**COLÁGENO TIPO I.** Se caracteriza porque la molécula de tropocolágeno en este caso está constituida por dos cadenas que se denominan alfa I, o sea, dos cadenas alfa I idénticas y una segunda cadena que se denomina alfa II, que tiene una secuencia de aminoácidos distinta.

**COMPRESIÓN.** El esfuerzo de compresión es una presión que tiende a causar en algunos casos una reducción de volumen, siempre manteniendo una masa constante.

**CRIOPRESERVACIÓN.** Es el proceso en el cual células o tejidos son conservados mediante su congelación a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**DIFERENCIACION CELULAR.** Es el proceso por el que las células adquieren una forma y una función determinada durante el desarrollo embrionario o la vida de un organismo pluricelular, especializándose en un tipo celular.

**EFFECTO ESTÉRICO.** En general, es el efecto relacionado con el volumen de un sustituyente. Cuando un sustituyente produce interacciones espaciales entre sus átomos y otros átomos o grupos de átomos nos encontramos frente a un efecto estérico de dicho sustituyente.

**ELASTINA.** El principal componente de las fibras elásticas es la elastina, material proteico muy insoluble. Se caracteriza por un alto contenido en aminoácidos apolares como prolina y valina y tiene un alto contenido en aminoácidos no cargados como la glicina. Contiene además dos aminoácidos exclusivos: desmosina e isodesmosina. Las moléculas de elastina se segregan al espacio extracelular donde forman filamentos y capas en los que las moléculas de elastina presentan un gran número de puentes cruzados entre ellas, dando lugar a una extensa red.

**ENCAPSULAR.** Acción de inmovilizar células en una matriz artificial.

**FETAL BOVINE SERUM (FBS).** Es un suero tomado de fetos de las vacas. Es el suero mas ampliamente usado en el cultivo de células.

**FIBROBLASTOS.** Son las células que producen las fibras y la sustancia intercelular amorfa de los tejidos conectivos. Es la célula más común, durante la etapa en que producen activamente sustancias intercelulares. Tamaño: 20 a 30 $\mu$  de largo por 10  $\mu$  de ancho. El núcleo es claro, grande, redondo u oval con cromatina finamente granular y nucléolo prominente. La ultra estructura de esta célula es característica de células que secretan proteínas de manera muy activa. Aunque consideradas células fijas del tejido conectivo los fibroblastos son capaces de efectuar algunos movimientos. Rara vez experimentan división celular, pero pueden hacerlo durante la cicatrización de heridas. Cuando estas células disminuyen su actividad se las denomina fibrocitos.

**FIBROSIS.** Es la formación o desarrollo en exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo, en contraposición a la formación de tejido fibroso como constituyente normal de un órgano o tejido.

**FOTOINICIADOR.** Es un compuesto arílico aromático no saturado mucho más sensible a la energía radiante que los monómeros y oligómeros. Las moléculas del fotoiniciador se descomponen al recibir energía radiante, y así formar radicales libres o cationes como fragmentos. Por lo tanto, los fotoiniciadores cumplen una función crítica en iniciar la polimerización por radicales libres o catiónica en los materiales.

**FOTOPOLIMERIZACIÓN.** Es un proceso de vinculación de monómeros con ayuda de la luz para formar un polímero.

**GLOTIS.** Es la porción más estrecha de la luz laríngea, espacio que está limitado por las cuerdas vocales.

**GLUTAMATO.** Es también conocido como ácido glutámico, es uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas.

**GLUCOSAMINOGLUCANO (GAG).** Los GAG, anteriormente conocidos como mucopolisacáridos, son largas cadenas de polisacáridos no ramificados, compuestas por unidades repetidas de disacáridos. Actualmente reciben el nombre de GAG debido a que uno de los 2 residuos de azúcar del disacárido repetido siempre es un aminoazúcar (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina). El otro típicamente es un ácido urónico (idurónico-glucurónico).

**HIDROFÍLIA.** Propiedad que favorece el contacto con el agua. En proteínas y péptidos, esto implica que las moléculas se pliegan y ordenan de manera que dejan expuestos al agua los aminoácidos más hidrofílicos y escondidos aquellos que son hidrofóbicos.

**HIDROGEL.** Red polimérica insoluble tridimensional, que absorbe y retiene una cantidad significativa de agua.

**HISTOLOGÍA.** Es la ciencia que estudia todo lo referente a los tejidos orgánicos: su estructura microscópica, su desarrollo y sus funciones.

**INMUNOGENICIDAD.** Propiedad que permite a una sustancia inducir una respuesta inmune detectable

**LAMINA PROPIA.** Es una lamina delgada del tejido conectivo la cual se encuentra debajo del epitelio y junto con el conforma la mucosa, membrana que cubre varios conductos de cuerpo.

**MACRÓMERO.** Es la parte mayor en que se divide un blastómero.

**MATRIZ ACELULAR.** Soporte sin células.

**MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).** Es una trama de macromoléculas extracelulares (proteínas y polisacáridos) organizada en el espacio extracelular de la mayoría de los tejidos. Además de actuar como cemento biológico universal también forman estructuras altamente especializadas como el cartílago, tendones, láminas basales, huesos y dientes.

**NICHO.** Espacio concreto ocupado por células para este caso.

**PASE DE CÉLULAR.** Es una técnica que permite a un individuo mantener las células vivas y creciendo bajo condiciones de cultivo por períodos del tiempo extendidos. Las células deben ser pasadas cuando tienen un 80%-100% de confluencia.

**PÉPTIDO.** Proteínas pequeñas, normalmente compuesta de no más de 60 aminoácidos.

**POLIPÉPTIDO.** Son cadenas constituidas por péptidos.

**POLISACARIDO.** Es una biomolécula formada por la unión de muchos monosacáridos. Se encuadran entre los glúcidos y cumplen funciones diversas, sobre todo de reserva energética y estructural.

**PROTEOGLUCANO.** Molécula que contiene tanto proteína como glucosaminoglucano, que son un tipo de polisacárido. Los proteoglucanos se encuentran en los cartílagos y en otros tejidos conjuntivos.

**RGD.** Es una corta secuencia de aminoácido, que contiene secuencias de adhesión celular.

**TEJIDO CONECTIVO.** El tejido conectivo propiamente dicho forma un compartimiento extenso y continuo en todo el organismo limitado por la lámina basal de los diferentes epitelios de revestimiento y de las glándulas que secretan hacia la superficie.

**TENSIÓN.** Es una fuerza que tira; por ejemplo, la fuerza que actúa sobre un cable que sostiene un peso.

**TROMBO.** Es un coágulo sanguíneo que se forma en un vaso y permanece allí.

**TROPOCOLÁGENO.** La unidad esencial del colágeno está constituida por tres cadenas de poli-péptidos que aparecen entrelazadas formando una triple hélice.

**XENOGENICA.** Células provenientes de donantes de otras especies.

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS ENCAPSULADAS EN HIDROGELES DE POLIETILENGLICOL EN PRESENCIA DE DIFERENTES POLISACARIDOS, CON FINES DE RECONSTRUCCIÓN DE TEJIDOS\*

**AUTORES:** Diana Rocio Ortiz Rodriguez  
Leidy Marcela Gelves Jerez\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Ingeniería de Tejidos, reconstrucción de tejidos, Polisacáridos, Biomateriales, MEC, FCVP, CMLAP, PEGDA.

### DESCRIPCIÓN:

El tratamiento de tejidos degenerados presenta un reto significativo en la medicina. La ingeniería de tejidos es un tratamiento prometedor para la restauración y regeneración de secciones corporales. Es importante investigar cómo las propiedades del biomaterial llegan a alterar el comportamiento de las células encapsuladas en este, lo cual es fundamental para el diseño racional en la ingeniería de tejidos. En esta investigación se estudiaron tejidos artificiales para: cuerdas vocales y arterias. El propósito fue evaluar el efecto de la adición de polisacáridos al soporte del biomaterial, observando: 1) Los componentes de la matriz extracelular (MEC) producida por cada tipo de células. 2) Las propiedades mecánicas de cada tejido artificial. Se realizó la encapsulación de las principales células de cada tejido por fotopolimerización de hidrogeles de polietilenglicol diacrilado (PEGDA) (10000PM), material similar al entorno bioquímico que da soporte como red estructural. El péptido de adhesión, *Arg-Gly-Asp* (RGD), fue injerto dentro de la red del hidrogel para imitar el medio adhesivo celular. Se obtuvieron los resultados de los análisis bioquímicos (ADN, Colágeno y Elastina), Histológicos y mecánicos, con los cuales se llegaron a la conclusión que el mejor material para reconstrucción de cuerdas vocales es el hidrogel que contenía alginato y el mejor material para reconstrucción de arterias es el hidrogel que contenía condroitin sulfato.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química Director: Mariah Hahn

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF CELL BEHAVIOR IN A SYNTHETIC EXTRACELLULAR MATRIX OF POLYETHYLENE GLYCOL IN THE PRESENCE OF SEVERAL POLYSACCHARIDES FOR TISSUE RECONSTRUCTION\*

**AUTHORS:** Diana Rocio Ortiz Rodriguez  
Leidy Marcela Gelves Jerez\*\*

**KEY WORDS:** Tissue Engineering, Tissue Reconstruction, Polysaccharides, Biomaterials, ECM, PVFF, PASM, PEGDA.

### DESCRIPCION:

The degenerated tissue treatment presents significant challenges for the medicine. Tissue engineering is a promising treatment to restoration or regeneration corporal sections. It is important to investigate how biomaterials properties alter cell behavior, which is fundamental for rational tissue engineering design. In this investigation two different artificial tissues were studied: vocal fold and artery. The purpose is to assess the effect of polysaccharide addition to scaffold, observe: 1) Matrix extracellular components (ECM) produced for each type cell. 2) The mechanical properties for each artificial tissue. The principal cells of each tissue were encapsulated by photopolymerization in PEGDA hydrogel (MW 10,000) similar material to biochemical environment and network structure. Cell adhesive peptide, *Arg-Gly-Asp* (RGD), was grafted into hydrogel network to mimic cell adhesive environment.

---

\* Project of grade

\*\* Ability of Physiochemical Engineerings. School of Chemical Engineering, Director Mariah Hahn

## INTRODUCCIÓN

En el mundo anualmente millones de personas mueren debido a la deficiencia de donantes de órganos con tejidos vitales que han sido degenerados por enfermedades, destruidos en accidentes o dañados por otras causas. Estos tejidos muchas veces no pueden ser recuperados con terapias o reemplazados, siendo esta la principal razón del surgimiento de la ingeniería de tejidos, que intenta evitar el riesgo de respuestas inmunológicas, así como también infecciones virales debidas al uso de injertos de células propias.

En el mundo se estima que el 3%-9% de la población sufre de desordenes en las cuerdas vocales en el transcurso de la vida [1]. En la cicatriz de las cuerdas vocales, el tejido fibroso, cuya formación es inducida por la respuesta a lesión o inflamación, es la mayor causa de la perdida de voz y es frecuentemente difícil de tratar [1-5]. Las metas de los tratamientos de la cicatriz de las cuerdas vocales son: 1). Disminución del total de los agarrotamientos e incrementar la flexibilidad; 2). Reducir la fuerza asociada con producción de la voz y la fatiga vocal; 3). Mejorar totalmente la cualidad de la voz [5]. Algunos tratamientos médicos están siendo desarrollados para la cicatrización de las cuerdas vocales con el fin amortiguar o reemplazar el tejido cicatrizado. Sin embargo, los actuales tratamientos clínicos han producido resultados irregulares y poco óptimos, lo cual hacen de la cicatrización de las cuerdas vocales uno de los mayores problemas en espera de mejoría en el futuro [4].

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los países industrializados. Para tratar las variedades de problemas arteriales son necesarias grandes cantidades de sustitutos de venas y arterias. Actualmente injertos humanos (venas y arterias) o materiales para prótesis como el dacron son usados para estos propósitos. Sin embargo, estos sustitutos no parecen crecer ni

remodelar el tejido, además son propensos a complicaciones como trombosis, calcificación e infecciones. Por esta razón se busca mejorar los sustitutos de las arterias y vasos sanguíneos en general, alternativas biológicas a estos sustitutos que tengan el potencial de crecer y remodelar sin complicaciones inmunológicas.

El concepto básico de ingeniería de tejidos incluye un soporte donde son sembradas células que pueden organizar y desarrollar un tejido dentro de un órgano previamente deseado para la implantación. El soporte provee el perfil biomecánico inicial mientras que las células producen una adecuada matriz extracelular. Durante la formación, deposición y organización de la nueva matriz generada, el soporte puede ser degradado o metabolizado dejando un tejido eventualmente formado. La matriz extracelular está conformada por Colágeno, Elastina y polisacáridos como Alginato (AA), Acido Hialurónico (AH), Heparin Sulfato (HS), Dermatán Sulfato (DS) y Condroitin Sulfato (CS) principalmente.

El propósito de este trabajo se centra principalmente en el estudio del comportamiento de las células soportadas en hidrogeles de polietilenglicol diacrilado (PEGDA) con polisacáridos, aditivos usados para simular la matriz extracelular de los fibroblastos y las células de músculo liso arterial. Siendo estas células el pilar de los tejidos de las cuerdas vocales y vasos sanguíneos respectivamente.

Es necesario aclarar que este trabajo no pretende diseñar el tejido para implantación directa, sino avanzar en el estudio del diseño de materiales con aplicaciones en la medicina (cicatrización de cuerdas vocales y enfermedades vasculares), que contribuyan a que los pacientes lleven una mejor calidad de vida.

## I MARCO TEORICO

### 1.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La Ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario que incorpora los principios de biología, química, ingeniería y medicina para desarrollar, mantener o mejorar la función de un tejido. Esta tiene ventajas particulares sobre otras terapias basadas únicamente en el uso de medicamentos, debido a que provee una solución permanente al problema del tejido degenerado.

El tejido artificial debe ser mecánicamente estable y capaz de funcionar biológicamente en el sitio de implante, la estabilidad mecánica es principalmente dependiente de la selección del biomaterial, el diseño de la estructura de soporte y la interacción célula-material. El funcionamiento biológico está regulado por señales biológicas como factores de crecimiento, la Matriz Extra Celular (MEC) y las células circundantes. Las moléculas de la MEC que rodean las células, proveen soporte mecánico y regulan la actividad celular.

La investigación ha mostrado que la relación entre densidad y organización de los componentes de la MEC determinan las propiedades bioquímicas y mecánicas del tejido y estas son cambiadas en la cicatrización del tejido [1-5,7].

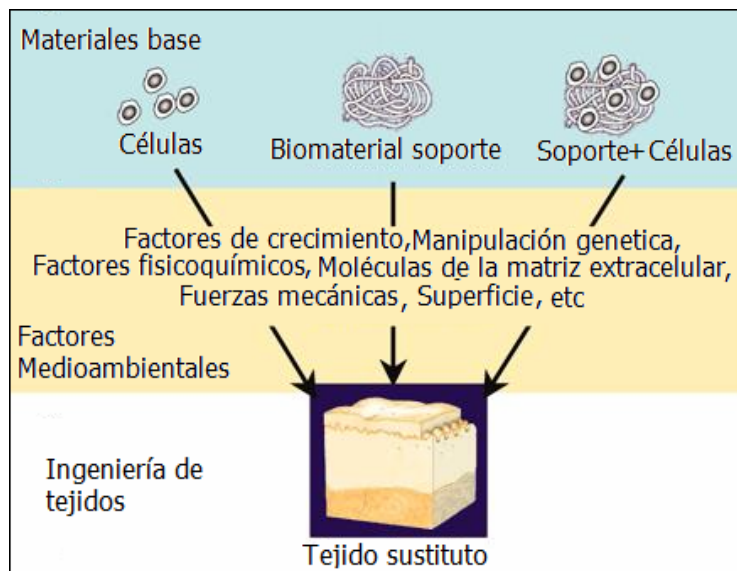
El colágeno es una de las estructuras más importantes en la constitución del MEC, también es extremadamente decisivo como cojinete contra el esfuerzo y resistencia a la deformación. La elastina permite que el tejido regrese a su forma original después de la deformación [3,7]. Otro importante componente de la MEC es el glucosaminoglucano (GAG), este se encuentra negativamente cargado y es fuertemente hidrofílico, esto permite al tejido absorber una gran cantidad de agua y soportar grandes fuerzas de compresión [29].

La meta última en el diseño de los soportes es la producción de una estructura ideal que reemplace la MEC natural hasta que las células anfitrionas puedan repoblar y resintetizar una nueva matriz natural. Para lograr esta meta el soporte

debe ser cuidadosamente seleccionado y diseñado para asegurar que las células sembradas sean biocompatibles con la estructura de soporte.

Como se esquematiza en la Figura 1. la propuesta de la ingeniería de tejidos está clasificada en tres categorías: (i) solo células, (ii) células encapsuladas en un soporte y (iii) estructura acelular. Cada una de estas propuestas puede ser realizada por unos factores artificiales micro medioambientales [17].

Figura 1. Enfoques de la Ingeniería de tejidos [17].



La estrategia más común en la ingeniería de tejidos es usar una estructura como soporte y guía para simular un nicho a las células vivas y así generar tejidos (ver Figura 1. Materiales base, imagen de la derecha).

El material de la estructura de soporte y las células deben ser biocompatibles y su biocompatibilidad puede ser clasificada en superficial y estructural, las cuales están determinadas por la selección del material y la estructura del soporte, respectivamente. La superficial esta asociada con la superficie química del material; las características químicas de la superficie de un material mediarán la absorción de moléculas biológicas que regulan actividades celulares como la adhesión y la migración.

Las fuentes de células para implantación pueden ser de un tejido propio del paciente (células *Autologous*), células provenientes de un donador humano quien no es inmunológicamente idéntico al paciente (células *Allogeneic*) y células provenientes de donantes de otras especies (células *Xenogenic*). Cada categoría puede clasificarse en células diferenciadas y polifuncionales.

## **1.2. CÉLULAS UTILIZADAS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

Los tejidos y tipos de órganos utilizados en las investigaciones de Ingeniería de tejidos provienen generalmente de mamíferos.

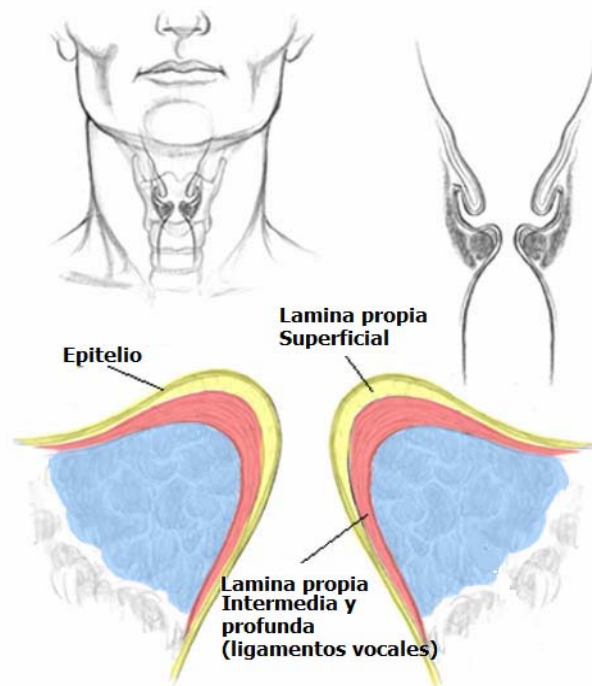
Hay dos técnicas básicas para la recolección de células. En la primera se obtiene una muestra de un órgano específico por biopsia, esta técnica se aplica a la mayoría de los órganos (piel, hígado, corazón, etc.). Sin embargo, para algunos tejidos como las válvulas del corazón o la medula espinal, la biopsia no es factible, por lo que se propone el aislamiento de células polifuncionales; estas tienen la habilidad de proliferarse a través de múltiples generaciones en condiciones adecuadas de cultivo y el potencial de diferenciarse en el tipo de células que se desee. Las células polifuncionales pueden ser derivadas de un donante adulto o un feto, pero para investigación no se acostumbra a usar células humanas o fetales debido a que tienen altos costos de mantenimiento, problemas legales, éticos e inmunológicos [33].

**1.2.1. Células diferenciadas** Durante el desarrollo embrionario de un organismo pluricelular las células adquieren una forma y una función determinada, especializándose en un tipo celular, éste proceso se llama diferenciación celular.

*En este estudio se utilizaron células diferenciadas de un modelo porcino (Xenogenic), debido a la similitud de órganos que ha mostrado este mamífero con el humano. El uso de células Xenogenic para reconstrucción de tejidos es controversial, debido a la posibilidad de transmisión de enfermedades de animales a humanos, pero su uso en la investigación es muy amplio por a su bajo costo y por tener menores problemas a nivel biológico y ético [33].*

**1.2.1.1. Fibroblastos de cuerdas vocales (FCV)** El rendimiento de la voz es principalmente dependiente de la lámina propia (LP). La LP en las cuerdas vocales humanas es un tejido conectivo compuesto de una lámina propia superficial LPS, lámina propia intermedia LPI y una lamina propia profunda LPP. Estudios han demostrado que la mayoría de las lesiones están limitadas a la LPS [6] (Figura 2.). El componente principal de la LP son los *Fibroblastos* [6,8]. La lámina propia ha sido descrita como visco-elástica, mostrando estas dos propiedades, viscosidad y elasticidad. Estas propiedades del tejido de las cuerdas vocales son el factor clave para la vibración de las mismas, afectando así variables como el umbral de presión de fonación [6].

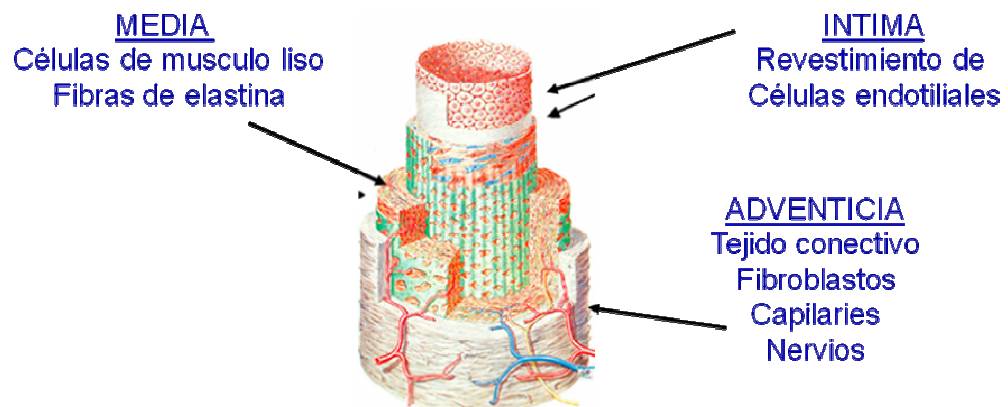
Figura 2. Anatomía de las cuerdas vocales humanas [5].



Generalmente la cicatrización cambia la estructura visco-elástica de la LP y causa un incremento en la rigidez de la estructura vibratoria, por lo tanto la agitación normal de la mucosa es trastornada durante la fonación, que resulta en ronquera o voz rasposa, incrementando el esfuerzo vocal, ruptura de voz, fatiga vocal y en general pérdida de la cualidad de la voz [2-5]

**1.2.1.2 Células de Músculo Liso Arterial (CMLA)** Las arterias están compuestas de tres láminas, cada una confiere propiedades funcionales específicas (Figura 3.). La lamina interior está compuesta de células endoteliales, su función es prevenir la formación espontanea de trombos en las arterias. La lamina media está compuesta por *células de musculo liso* y sus secreciones, las cuales conforman una densa red de colágeno, elastina y glucosaminoglucanos, es el soporte fundamental de la pared arterial, siendo este el medio que provee la fuerza mecánica de las arterias y la habilidad para contraerse o relajarse como respuesta a estímulos externos. La lamina exterior (Adventicia) compuesta principalmente de fibroblastos, vagamente organizados [34-35].

Figura 3. Anatomía de las arterias humanas.



Para este caso de estudio se escogieron las *células de musculo liso arterial* debido a que son las productoras de los componentes básicos de la matriz extracelular y junto con ella conforman la lámina principal de las arterias (Lamina media).

### 1.3. ESTRUCTURA DE SOPORTE

Existe una amplia clasificación de biopolímeros naturales a polímeros sintéticos, que pueden ser utilizados como soportes en ingeniería de tejidos, los más comúnmente usados son biopolímeros naturales que incluyen una matriz desmineralizada, agarosa, colágeno, polisacáridos entre otros. Los polímeros

sintéticos que son usados, incluyen poliésteres degradables, como: ácido *Poliglicólico* (APG), ácido *Poliláctico* (APL) y otros copolímeros, como *Poli-(DL-láctico-glicólico)*.

Los materiales del soporte son decisivos en la ingeniería de tejidos, este no solo proporciona un apropiado ambiente para las células vivas sino que también sirve como guía y estimulante de la producción de la MEC, influenciando de esta forma el resultado del tejido [17,29]. Cambios en las características como en la red estructural, las propiedades mecánicas o bioquímicas pueden causar diferentes respuestas celulares [17,18], creando una gran demanda de información para entender las características del material de soporte y las respuestas celulares; tanto que la respuesta celular puede ser optimizada ajustando las condiciones del material de soporte. Sin embargo, las características del soporte son usualmente interdependientes y esto hace difícil investigar la dependencia de la respuesta celular en las propiedades del mismo. Por ejemplo, la talla de porosidad de la red del hidrogel es interdependiente con las propiedades mecánicas, por lo tanto la respuesta celular en el hidrogel resulta de ambos parámetros [24, 25]. Es necesario crear un soporte tridimensional en donde el impacto de las propiedades del material en el comportamiento celular pueda ser sistemáticamente explorado.

Las propiedades mecánicas de un hidrogel específico son extremadamente importantes para la selección de materiales adecuados según el tipo de aplicación. Estas propiedades son mejor entendidas usando las teorías de caucho elástico y visco-elástico. Así es posible analizar la estructura y su posible aplicación.

Los cauchos elásticos son materiales que responden a los esfuerzos casi inmediatamente y con deformación completamente reversible. Están formados por redes entrecruzadas con un gran volumen libre, volumen que les permite responder al esfuerzo externo con un rápido reordenamiento de sus cadenas. Cuando un hidrogel está en la región de comportamiento como caucho elástico, el comportamiento mecánico es principalmente dependiente de la arquitectura de la

red del polímero.

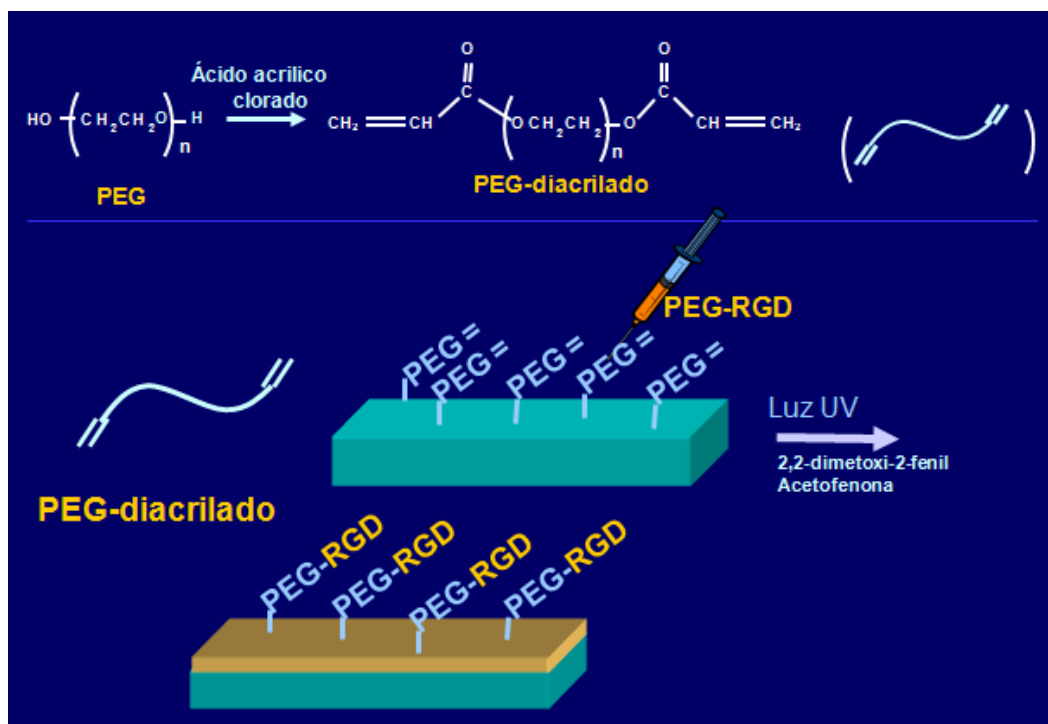
La teoría visco-elástica considera las relaciones entre la elasticidad, el flujo y el movimiento molecular del material. El tamaño de las moléculas de los polímeros frecuentemente conduce a una respuesta visco-elástica. En general, un polímero puede tener muchos procesos visco-elásticos cada uno asociado con un movimiento molecular particular.

### **1.3.1. Materiales para la construcción del soporte**

**1.3.1.1. Polietilenglicol Diacrilado (PEGDA)** Los hidrogeles de PEG han sido escogidos para fabricar la estructura de soporte debido a su amplia bio-funcionalidad, semi-permeabilidad, velocidades de degradación y a la facilidad de modificar sus propiedades mecánicas, para hacerlas similares a las de los tejidos que se quieran reconstruir (cuerdas vocales y tejido arterial). El monómero principal del PEG puede ser modificado fácilmente controlando el peso molecular, modificando su cadena para otorgar las propiedades mecánicas deseadas. Debido a la hidrofilia y a los efectos estéricos causados por las cadenas móviles del PEG, los hidrogeles son intrínsecamente resistentes a la absorción toxinas del medio y a la adhesión celular superficial, los cuales eliminan la influencia de las células del medio de cultivo [23, 24].

En este trabajo se usaron hidrogeles de PEGDA para estudiar el efecto que produce la adición de polisacáridos sobre las propiedades mecánicas y en la producción de los componentes de MEC por parte de las células de musculo liso arterial y los fibroblastos. Fue necesaria la diacrilación del PEG (ver Figura 4.) para posibilitar los enlaces con el péptido de adhesión celular RGD, y así obtener un material bioactivo que interaccione con las células.

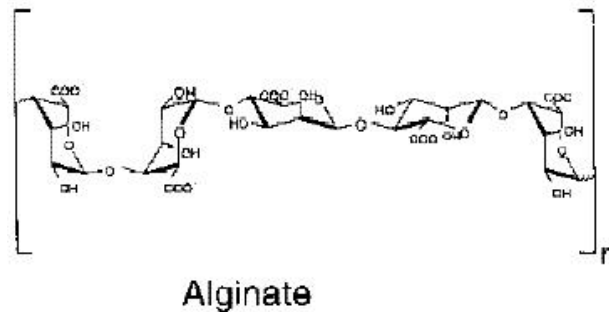
Figura 4. Reacción de diacrilación del PEG y esquematización de la adición de RGD.



Si bien muchas investigaciones han sido conducidas acerca del efecto de las propiedades del hidrogel sobre la respuesta celular, esto no es claro aún [22-26].

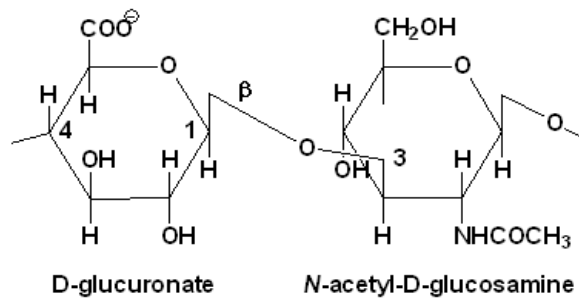
**1.3.1.2 Alginato (AA)** Es un polisacárido aislado de algas marinas, usado como vehículo de reparto inyectable e inmovilizador en la MEC debido a sus ligeras propiedades de gel [31]. Está formado por una familia de copolímeros ácidos de  $\beta$ -D-manuronato y  $\alpha$ -L-guluronato. Sus gels se forman en presencia de iones divalentes, tales como  $\text{Ca}^{+2}$  [31], en la Figura 5 se muestra el monómero del Alginato (AA). Las propiedades físicas y mecánicas del gel de AA están fuertemente correlacionadas con la proporción y detalle del poli-guluronato bloqueado en sus cadenas. Entre las ventajas del AA se incluyen su amplia disponibilidad, la baja barrera de difusión de nutrientes y relativa biocompatibilidad. Sin embargo, el alginato no es biodegradable en el cuerpo humano y exhibe variaciones de composición y pureza de lote a lote [29].

Figura 5. Monómero del Alginato



**1.3.1.3. Ácido Hialurónico (AH)** Es un polisacárido, glucosaminoglucano (GAG), distribuido ampliamente a través del tejido conectivo, epitelial y neutral. Es un importante componente de la MEC, por lo tanto tiene numerosas cualidades atractivas para aplicaciones en la ingeniería de tejidos. Compuesto por unidades repetidas de D-N-acetil glucosamina y D-glucuronato (ver Figura 6.), ligados alternando las uniones glicosidicas  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,3. El ácido hialurónico (AH) está involucrado en numerosos eventos biológicos en vivo [24,31].

Figura 6. Monómero de Ácido Hialurónico

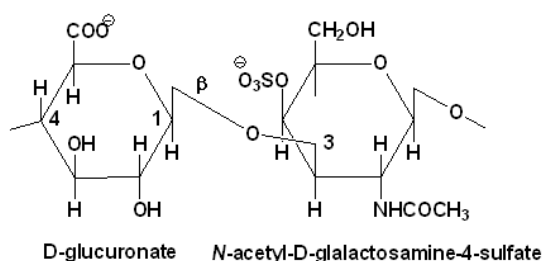


El AH es degradable por una familia de enzimas llamadas Hialuronidasas, el cuerpo humano cuenta con al menos 7 tipos de hialuronidasas como enzimas. La Angiogénesis es promovida por el AH degradado y este se encuentra también envuelto en la diferenciación, proliferación y migración de las células durante la cura de una herida. Los materiales basados en AH están emergiendo como un soporte para aplicaciones en la Ingeniería de tejidos, incluyendo la creación de tejidos para huesos y cartílagos [30].

Muchas de sus propiedades, incluyendo su biocompatibilidad, visco-elasticidad y falta de inmunogenicidad, han hecho de éste un material atractivo para una variedad de aplicaciones.

**1.3.1.4. Sulfato de Condroitina (o Condroitin Sulfato, CS)** Es un glucosaminoglucano (GAG) sulfatado, está formado por una familia de copolímeros ácidos de  $\beta$ -D-glucuronato y N-acetil-D-galactosamina-4-sulfato (ver Figura 7.).

Figura 7. Monómero de Sulfato de Condroitina



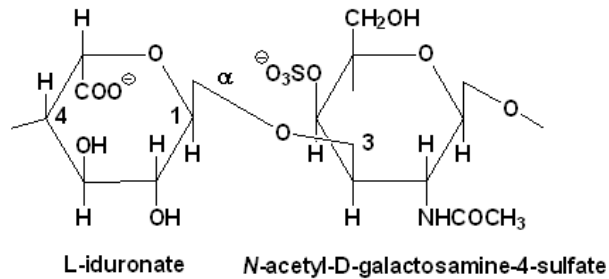
Su función es ampliamente dependiente del proteoglucano del cual se encuentra haciendo parte, pero se puede clasificar en estructural y regulatoria. Estructuralmente es el mayor componente de la matriz extracelular y es el encargado de mantener la integridad de los tejidos debido a su gran resistencia a la compresión. Su función regulatoria consiste en interactuar con ciertas proteínas de la MEC para regular el orden de algunas actividades celulares, también regula el crecimiento y desarrollo de sistema nervioso y su respuesta cuando es lastimado [37].

**1.3.1.5. Dermatan sulfato (DS)** Es un polisacárido formado por la unión de  $\alpha$ -L-iduronato y N-acetil-D-galactosamina-4-sulfato (ver Figura 8.), este último grupo funcional lo ubica en las familias de glucosaminoglucanos sulfatados.

Este glucosaminoglucano se encuentra básicamente en la piel, pero también en arterias, válvulas del corazón, tendones y ligamentos. Su función principal es

ayudar en la coagulación, enfermedades cardiovasculares, cancerígenas, curación de heridas y fibrosis [37].

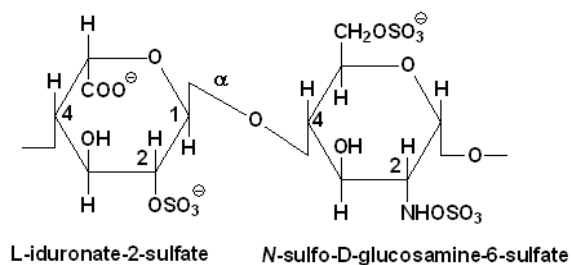
Figura 8. Monómero de Dermatan Sulfato



**1.3.1.6. Heparin Sulfato (HS)** Es un polímero con un rango de peso molecular de 3 kDa a 40 kDa, pero su peso molecular mas comercial se encuentra entre 12 kDa y 15 kDa. Es un miembro de la familia de los glucosaminoglucanos y consiste en una variedad sulfatada de disacáridos repetidos.

Por su efecto anticoagulante es ampliamente usado en anticoagulantes inyectables, para prevenir la formación de coágulos, o evitar el crecimiento de los ya existentes en las corrientes sanguíneas [37], monómero mostrado en la Figura 9.

Figura 9. Monómero de la Heparin Sulfato



## II DESARROLLO EXPERIMENTAL

La evaluación de los componentes de la MEC y de las propiedades mecánicas de los hidrogeles, que contenía los fibroblastos y las células de musculo liso arterial encapsuladas por fotopolimerización, se llevó acabo de la siguiente forma:

### 2.1. SÍNTESIS DE LOS POLISACÁRIDOS

La metacrilación de los polisacáridos fue preparada por reacción de una solución al 15% w/v de cada polisacárido con Metacrilato Anhídrido (Merck) con 10 veces de exceso molar, el pH fue ajustado entre 8 y 9 con NaOH (5N FISHER). A esta mezcla se le permitió reaccionar a 4°C durante 24 horas, con agitación. Los polisacáridos fueron posteriormente precipitados y lavados con etanol (95%), previamente enfriado. Estos fueron disueltos en agua y puestos en membranas de diálisis, para hacer diálisis inversa con varios cambios de agua doblemente destilada durante 2 días. Este producto fue liofilizado [31].

El ácido hialuronico metacrilado (AH-MA) fue utilizado como el ácido hialuronico de alto peso molecular (AH-APM). Para obtener el ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM) fue necesario hacer una digestión enzimática usando una mezcla de 5 Unidades/ml de hialuronidasas (HAse) y 1mg/ml de ácido hialuronico metacrilado en una solución salina de fosfato (PBS, HYCLONE), a 37°C durante toda la noche, posteriormente se desactivó la acción de la enzima calentando a 80°C durante una hora.

Los polisacáridos utilizados para la encapsulación de fibroblastos fueron: Alginato, Ácido hialuronico de alto peso molecular y Ácido hialuronico de bajo peso molecular. Por su parte, los polisacáridos utilizados para la encapsulación de células de musculo liso fueron: Ácido hialuronico de bajo peso molecular, Heparin sulfato, Dermatan sulfato y Condroitin sulfato.

## **2.2. MANTENIMIENTO CELULAR**

Los fibroblastos y las células de musculo liso son los principales encargados de la producción de los componentes de la MEC, en las cuerdas vocales y en las arterias respectivamente, estas células fueron tomadas de crio-preservación (tanque de nitrógeno líquido) donde se encontraban congeladas en un medio, compuesto de DMSO + DMEM, que impedía la formación de cristales de agua que rompen la pared celular, con un número de pase 4 para los fibroblastos y 7 para las células de musculo liso arterial, este pase determina la edad celular y su numeración se asigna cada vez que se hace expansión celular a otros frascos de cultivo. El cultivo expandido fue mantenido en una incubadora (ver Anexo II) a 37°C/5% CO<sub>2</sub> y propagado hasta pase 14, para los dos tipos de células, en frascos para cultivo con medio DMEM (Cellgro) suplementado con Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma) al 10%, penicilina 50µg/ml y estreptomycin 50µg/ml, este medio suple las necesidades energéticas y mantiene las células libres de contaminación. Los frascos fueron mantenidos con una población celular menor al 80% del frasco para evitar confluencia (sobre población celular), revisados bajo el microscopio (Dato mostrado Anexo II).

## **2.3. ENCAPSULACIÓN CELULAR Y CULTIVO**

Las células fueron removidas de los frascos de cultivo (ver Anexo II) con una solución enzimática (Tripsina, HYCLONE) que reaccionó con las proteínas que adhieren las células al frasco, luego fueron centrifugadas para remover el exceso de medio y mezcladas homogéneamente con las soluciones de polietilenglicol diacrilado (10% de PEGDA) que contenían los polisacáridos anteriormente mencionados (5mg/ml para la encapsulación de los fibroblastos y 1mg/ml para la de células de musculo liso arterial), estas soluciones se prepararon disolviendo los sólidos (PEGDA y cada polisacárido) en una solución tamponada de pH 7.4 (HBS), se agregó el aditivo celular (RGD) a 1µmol/ml mas un fotoiniciador llamado Acetofenona al 1% [31], y finalmente fueron esterilizadas por filtración (filtro de

jeringa, 0.22um FISHERBRAND).

Las concentraciones celulares finales fueron de 1260000células/ml para los fibroblastos y de 540000células/ml para las células de musculo liso arterial. La cantidad de células vivas fue del 96.4% para los fibroblastos y 95% para las células de musculo liso arterial, confirmada inmediatamente previa a la encapsulación usando un indicador que marcaba las células muertas vistas en el microscopio.

De cada solución se tomó un mililitro para formar el hidrogel entre la plataforma previamente montada (ver Anexo II). Las plataformas fueron expuestas a luz ultra violeta durante 1 minuto por cada cara a una intensidad de 9-10 nW/cm<sup>2</sup> con una longitud de onda de 365nm (ver Anexo II). El biomaterial de células encapsuladas en el hidrogel fue cultivado bajo condiciones similares a las usadas en el mantenimiento celular.

#### **2.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS**

Las muestras fueron cosechadas a los 7, 21 y 35 días para los fibroblastos y a los 14, 28 y 35 días para las células de musculo liso arterial, con un perforador de 8mm de diámetro, almacenadas a -80°C, previamente congelados con nitrógeno líquido durante 10 min, para realizar los siguientes ensayos bioquímicos.

**2.4.1. Número de células:** Determinado por el ensayo de PicoGreen double-stranded ADN, de la siguiente forma:

Se prepararon soluciones iguales a las utilizadas para la encapsulación celular con la diferencia que estas no contenían células, a estas soluciones estándares se les adicionó diferentes cantidades de una sustancia que simulaba la presencia de ADN (Calfthymus DNA, FLUKA) para hacer los estándares marcables por el PicoGreen (Molecular PROBES) y así ser reconocidos por el equipo, para crear una curva estándar lineal. Estas soluciones se fotopolimerizaron con luz UV

durante 2min en micro-tubos (Eppendorf). A los hidrogeles estándar formados se les adicionó agua para que se hincharan igual que las muestras y se llevaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de la digestión, con el fin de conservar el número de ciclos de congelación-descongelación de las muestras.

Para digerir las muestras y los estándares se les adicionó 5 veces su peso de una solución de 0,12N de NaOH; se llevaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua durante 72 hrs. Pasado este tiempo se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min.

Se tomaron  $40\mu\text{l}$  para los fibroblastos y  $20\mu\text{l}$  para las células de musculo liso arterial de cada estándar y muestra en tubos individuales, se neutralizaron con HCl (1N). El volumen fue llevado a  $100\mu\text{l}$  adicionando una solución de TE buffer (ver Anexo I), también se adicionaron  $100\mu\text{l}$  PicoGreen reactivo de trabajo (ver Anexo I) en cada muestra y estándar; se incubaron durante 5 min, protegidos de la luz. Esta mezcla se introdujo en un plato de 96 pozos (blanco Costar, ver Anexo II) cada una por duplicado para medir fluorescencia, Excitación:  $\sim 480\text{ nm}$ , emisión  $\sim 520\text{ nm}$ . Con los resultados de los estándares se realizó la curva en donde se ubicaron las muestras, este resultado se tradujo a número de células usando el factor de conversión porcino de 6.6pg (pico gramos) de ADN por célula [28].

**2.4.2. Colágeno:** Fue medido indirectamente, la medición que se realizó fue de *hydroxiprolin*, un componente de las fibras de colágeno, el procedimiento se llevó a cabo de la siguiente forma:

Los estándares se prepararon sobre soluciones con igual concentración de PEGDA y polisacárido, según cada tipo de hidrogel, adicionando en diferentes cantidades de trans-4hydroxiprolin-L (10mg/ml), reactivo que proporcionó la medida de *hydroxiprolin* en los estándares. Estas soluciones se fotopolimerizaron con luz UV durante 2min. A los hidrogeles estándar formados se les adicionó agua para que se hincharan igual que las muestras y se llevaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de la digestión.

Se tomó el remanente de las muestras usadas en el ensayo que determina el número de células.

Para solubilizar el colágeno contenido se llevaron las muestras a una temperatura entre 95-100 °C durante 90min, se centrifugaron durante 10 min (10,000 rpm) y luego se transfirió el sobrenadante para ser analizado, dejando 20µl en el tubo para las pruebas de elastina.

A los estándares y a las muestras transferidas se les adicionó HCl (12N) con el fin de llevar su concentración a 6N, para llevar a cabo la hidrólisis ácida por incubación a 110°C, durante 18 horas. Después estas soluciones se secaron completamente en el Centrivap (≈3horas), posteriormente se reconstituyeron en 200µl de agua doblemente destilada, disolviendo completamente los pellets formados. Se tomaron alícuotas de 80µl de cada muestra y estándar por duplicado en pozos individuales (plato de 96 pozos, transparente, FISHER BRAND, ver Anexo II) a cada pozo se le adicionó 40µl de Cholramine-T (reactivo preparados, Anexo I) y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador orbital durante 15min, protegidos de la luz.

En cada pozo se adicionaron 40 µL de p-DMBA (reactivos preparados, Anexo I), posteriormente se incubó el plato a 37°C durante 30 min. Se hizo la medición con una densidad óptica de 550nm. Con los resultados de los estándares se realizó la curva en donde se ubicaron las muestras y el contenido de colágeno se calculó usando el factor de conversión 7.69mg de colágeno por 1mg de 4-hydroxiprolina (≈0.13).

**2.4.3. Elastina:** Fue determinada cuantitativamente mediante el ensayo de *Ninhydrin* para los hidrogeles que contenían los fibroblastos y cualitativamente para los hidrogeles que contenían las células de músculo liso arterial (Análisis Histológico).

El ensayo de *Ninhydrin* se llevó a cabo con el volumen remanente de las muestras

trabajadas para los ensayos anteriores. A cada muestra se le adicionaron 500 $\mu$ L de HCl (6N) y se incubó a 100°C, durante 18 horas. Posteriormente las muestras fueron secadas completamente en el Centrivap ( $\approx$ 3horas). Mientras las muestras se secaban se prepararon estándares con soluciones de Elastina en citrato de sodio a diferentes concentraciones en tubos de 1,5ml con tapa.

Los pellets obtenidos, después de secar las muestras, se redisolviéron en 110 $\mu$ L de citrato de sodio tamponado (reactivo preparado, Anexo I), seguidamente se le adicionó a cada muestra y estándar 110 $\mu$ L de marcador de elastina (ninhydrin reagent, SIGMA). Luego se pusieron en un baño de agua a 100°C durante 15min, transcurrido este tiempo se permitió que los tubos alcanzaran temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 50 $\mu$ L de cada muestra y estándar por duplicado en pozos individuales (plato de 96 Pozos, transparente, FISHER BRAND, ver Anexo II). La lectura del plato se realizó a 570nm. Con los resultados de los estándares se realizó la curva en donde se ubicaron las muestras. Las curvas estándares presentaron buena linealidad.

Todos los análisis bioquímicos se realizaron en el equipo Bio-tek synergy (Synergy Multi-detection Microplate Reade, FISHER SCIENTIFIC, ver Anexo II) Estos contenidos hallados cuantitativamente fueron normalizados por el número de células encontrados, con el análisis de ADN [25].

## **2.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS**

Las muestras tomadas para las pruebas histológicas fueron secadas en Crio-medio (OTC, Sakgraftsa, ver Anexo II) a 4°C durante una noche y almacenadas a -20°C.

Para la comprobación de la diferenciación celular, la localización del colágeno y la elastina, se cortaron las muestras en un equipo llamado Cryocut 1800, (Jung CM 1800, Hystotronic inc. Leica, ver Anexo II) con un espesor de 35 $\mu$ m y se hicieron

los ensayos histológicos de tinción, que consiste en utilizar un reactivo que da color a las células que contienen las sustancias que se están estudiando, por ejemplo, para localizar el colágeno se utilizó un anticuerpo que se tiñe de color rojo en presencia de colágeno, lo cual le permite ser observado.

Las secciones marcadas se fotografiaron usando un microscopio Axiovert 200M (Carl Zeiss, ver Anexo II).

Para las células de musculo liso arterial se realizó un análisis semicuantitativo para la elastina producida, que consistía en contar las células marcadas positivamente (Rojo) contra las células totales contenidas en las secciones estudiadas.

## **2.6 PRUEBAS MECÁNICAS**

Las propiedades mecánicas fueron medidas en modo de compresión (ver Anexo II), isotérmico, usando el Analizador Dinámico-Mecánico (Dynamic Mechanical Analyzer DMA Q800 V7.4 Build 126). El análisis dinámico-mecánico proporciona información cuantitativa de las propiedades visco-elásticas y reológicas del material, mediante la medida de la respuesta mecánica de la muestra sometida a esfuerzos periódicos [32].

En esta prueba dinámico-mecánica se aplicó una carga torzora senoidal a un lado de la muestra, un traductor de esfuerzo midió el esfuerzo aplicado; en el lado opuesto de la muestra, los cambios realizados a lo largo de la muestra fueron medidos con un transductor de deformación.

Esta prueba no se pudo realizar para el hidrogel de ácido hialuronico de alto peso molecular que contenía fibroblastos debido a que los hidrogeles presentaron una contaminación, por lo tanto las muestras tomadas solo fueron las suficientes para realizar los análisis bioquímicos.

### III RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICOS

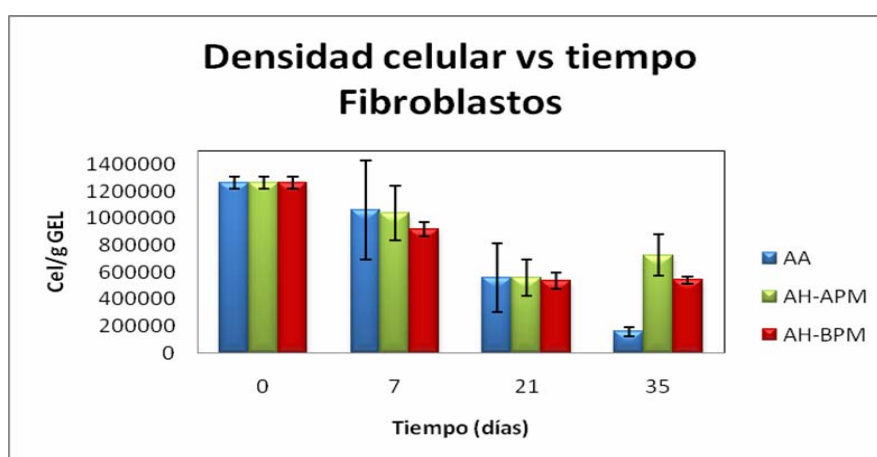
Los hidrogeles fueron comparados entre ellos en los siguientes términos:

#### 3.1 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

**3.1.1. Determinación del número de células** Durante el tiempo de cultivo se observó, bajo el microscopio, una notoria pérdida de fibroblastos en todos los hidrogeles, esta reducción se comprobó con el ensayo de PicoGreen ADN (ver Figura 10).

Una posible causa de la disminución celular en todos los hidrogeles en la primera semana es el estado de la células en el momento de la encapsulación, las células antes de la encapsulación son sometidas a altos niveles de estrés, en la centrifuga y por acción de la enzima (Tripsina), estrés que influye en la adaptación de las células al nuevo medio.

Figura 10. Densidad Celular vs Tiempo para los fibroblastos, Alginato (AA), Ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM), Ácido hialuronico de alto peso molecular (AH-APM).



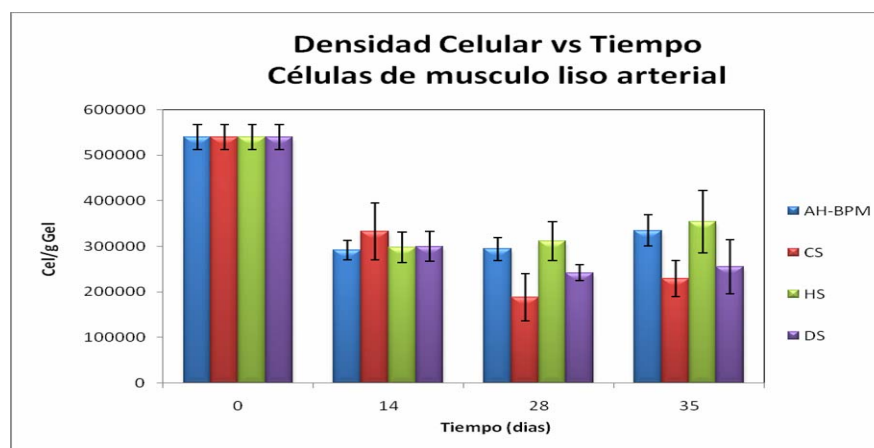
En el hidrogel de ácido hialuronico de alto peso molecular, que contenía fibroblastos, se presentó un débil cambio en su coloración, en la última semana de cultivo, muy probablemente debió a contaminación y como consecuencia de esto

se observa un aumento, del día 28 al día 35, en la medida del número de células, ver Figura 10.

Los hidrogeles con polisacáridos, glucosaminoglucanos (GAG), que contenían fibroblastos tuvieron una menor pérdida de células en el tiempo de cultivo, comparada con los hidrogeles con Alginato (AA).

Para los hidrogeles que contenían las células de musculo liso arterial se observa un cambio en el número de células entre tiempo en que se encapsularon las células (tiempo 0) y estos hidrogeles a los 14 días de cultivo (Figura 11), esto puede ser explicado porque el porcentaje de células vivas previa la encapsulación (95%) no es el mejor, comprobando también que el estrés en el momento de la encapsulación influye en la adaptabilidad celular al hidrogel.

Figura 11. Densidad Celular vs Tiempo para las células de musculo liso, Ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM), Condroitin sulfato (CS), Heparin Sulfato (HS) y Dermatan sulfato (DS)



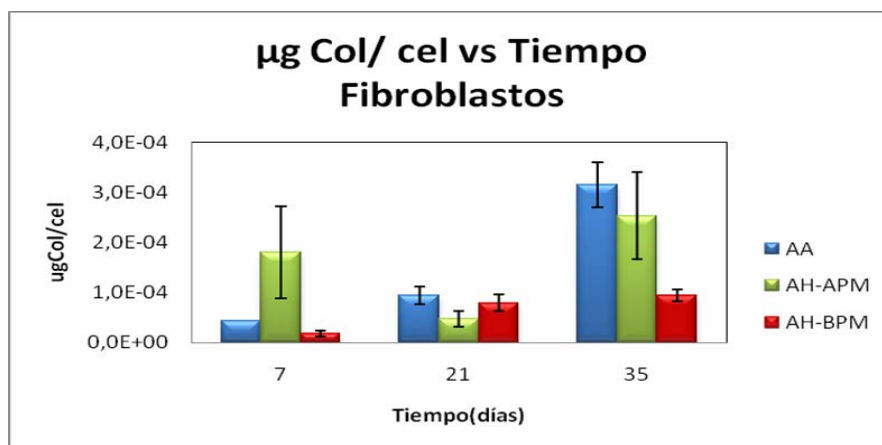
Se observa en la Figura 11 una composición aproximadamente constante de células durante el tiempo de cultivo (del día 14 al 35), mostrando que los geles que contienen algún tipo de glucosaminoglucano, presentan un ambiente más apropiado para el cultivo celular. Lo anterior es también observado en estudios anteriores [19]. Muy probablemente debido a la elevada viscosidad que le infiere

los glucosaminoglucanos a los hidrogeles, que evita el escape de las células hacia el medio.

**3.1.2. Cantidad de Colágeno producido por célula** En cuanto a la producción de fibras de colágeno medidas en forma de *hydroxiprolina*, se observa (Figura 12.) que los hidrogeles sin glucosaminoglucanos que contenían los fibroblastos (hidrogeles con Alginato) tienen mayor y constante producción de colágeno en comparación a los hidrogeles con este tipo de aditivo (ácido hialurónico).

En la primera semana el hidrogel con ácido hialurónico de alto peso molecular (Figura 12) tiene una notable diferencia con respecto a la medida de los demás hidrogeles, esta medida puede ser un error ratificado por su gran desviación estándar. El comportamiento en la síntesis de colágeno se puede considerar bajo para el hidrogel con ácido hialurónico de bajo peso molecular (Figura 12), comprobando estudios previos en hidrogeles que contenían ácido hialurónico [19, 30].

Figura 12.  $\mu\text{g}$  de colágeno producido por los fibroblastos durante el tiempo de cultivo, Alginato (AA), Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM), Ácido hialurónico de alto peso molecular (AH-APM).

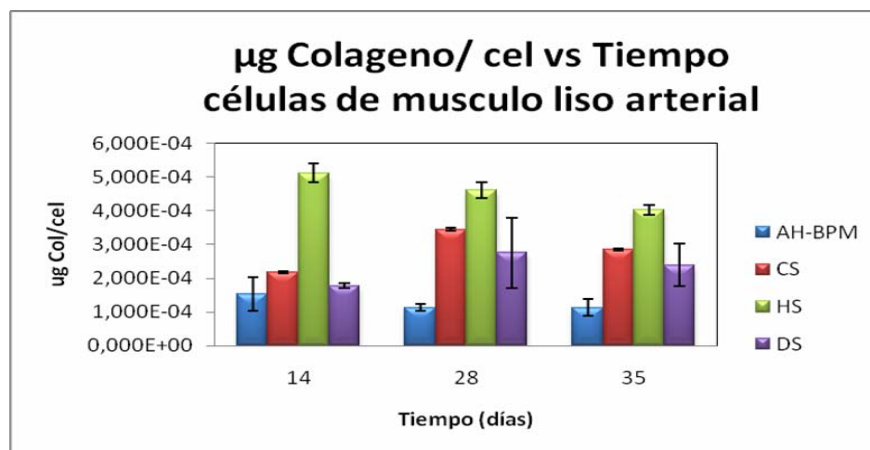


Los hidrogeles que contenían las células de músculo liso arterial (Figura 13) con Dermatan sulfato y Condroitin sulfato presentaron niveles intermedios de colágeno

y crecientes con el tiempo, pero en bajas proporciones.

Para los hidrogeles que contenían Heparin sulfato, se observó el más alto nivel de colágeno, notando una diferencia muy grande en la medida con respecto a los demás hidrogeles, esta medida puede reflejar la producción real de colágeno de los hidrogeles con este aditivo o pudo ser acrecentada por alguna interferencia del Heparin, ya que este, a diferencia de los demás glucosaminoglucanos, tiene dos disacáridos sulfatados (Figura 9).

Figura 13.  $\mu\text{g}$  de colágeno producido por las células de musculo liso arterial durante el tiempo de cultivo, Ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM), Condroitin sulfato (CS), Heparin Sulfato (HS) y Dermatatan sulfato (DS)

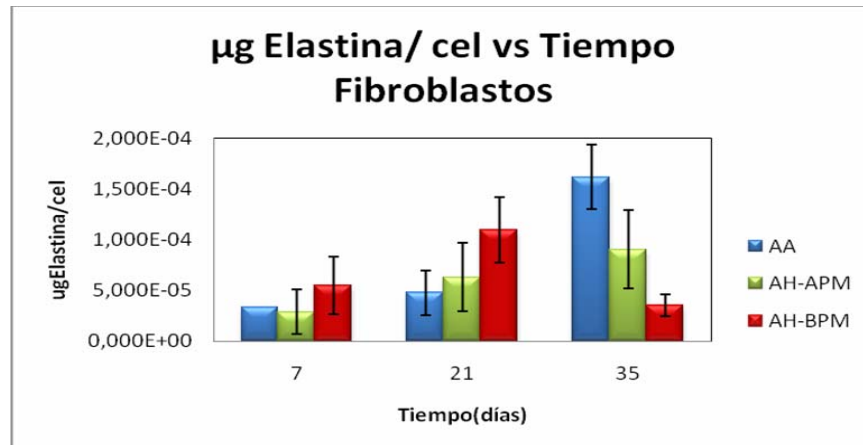


Para los hidrogeles con ácido hialuronico de bajo peso molecular que contenian las células de musculo liso arterial se observa una baja producción de colágeno (Figura 13), esto confirma el comportamiento presentado por los hidrogeles con ests tipo de aditivo que contenian los fibroblastos.

**3.1.3. Cantidad de Elastina producida por célula** Al igual que las fibras de colágeno, la elastina se produjo en mayor cantidad en los hidrogeles que contenían Alginato, aunque la producción fue menor en las primeras semanas en comparación con los demás hidrogeles que contenían los fibroblastos, la elastina tuvo su mayor producción en este hidrogel después del día 21 de cultivo,

presentado un incremento apreciable (Figura 14).

Figura 14.  $\mu\text{g}$  de elastina producida por los fibroblastos durante el tiempo de cultivo, Alginato (AA), Ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM), Ácido hialurónico de alto peso molecular (AH-APM).



En general la producción de elastina en los hidrogeles que contenían los fibroblastos presentó un comportamiento de crecimiento constante, a una baja velocidad (Figura 14).

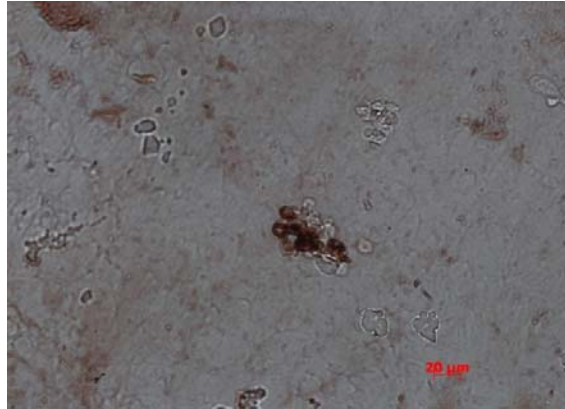
En las últimas semanas el hidrogel de ácido hialurónico de bajo peso molecular exhibió un decrecimiento (Figura 14), fueron realizadas contra muestras para corroborar este dato obtenido, muestras con las cuales se obtuvieron los mismos resultados esto pudo ser debido al cambio de lote del reactivo Ninhydrin.

### 3.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Para los fibroblastos y células de músculo liso arterial se obtuvieron las secciones marcadas positivamente, células manchadas de rojo, de los siguientes tipos:

**3.2.1. Diferenciación Celular** La pureza de la expansión celular de fibroblastos fue verificada positiva, mediante el análisis histológico utilizando el marcador Vimentin, exclusivo para los fibroblastos.

Figura 15. Imagen tomada con microscopio Axiovert 200M (Objetivo 20X) para análisis histológico de tinción con Vimentin; ácido hialurónico de bajo peso molecular, tiempo de 35 días para los fibroblastos.



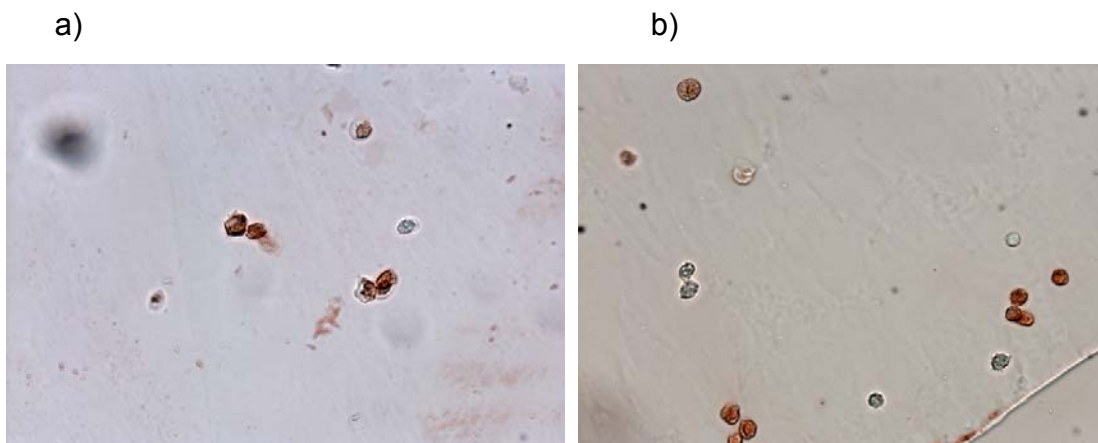
Con los ensayos realizados en la primera y la última semana del cultivo se obtuvieron imágenes como la presentada en la Figura 15, donde se muestra en el centro un cumulo de células teñidas de rojo, lo que indica que las células encapsuladas se comportaron como fibroblastos ya que marcaron positivo ante el Vimentin.

Para comprobar el comportamiento de las células diferenciadas en células de musculo liso arterial se usan marcadores que estas células producen según la etapa de diferenciación en que se encuentren, (calponin, MHC y Actin de menor ,a mayor etapa).

Como se muestra en la Figura 16, las células mostraron un comportamiento de células de musculo liso arterial ya que se tiñeron de rojo ante los marcadores de diferenciación.

Para las células encapsuladas en hidrogeles con Dermatan sulfato se observó un mayor número de células pigmentadas al marcador de actin, Figura 16 b). y las células que contenían ácido hialurónico de bajo peso molecular mostraron mejor respuesta para el marcador MHC, Figura 16 a).

Figura 16. Imagen tomada con microscopio Axiovert 200M (Objetivo 20X) para análisis histológico de diferenciación de las células de musculo liso arterial a los 35 días de cultivo a) MHC para hidrogeles con ácido hialuronico de bajo peso molecular; b) Actin para hidrogeles con Dermatan sulfato.



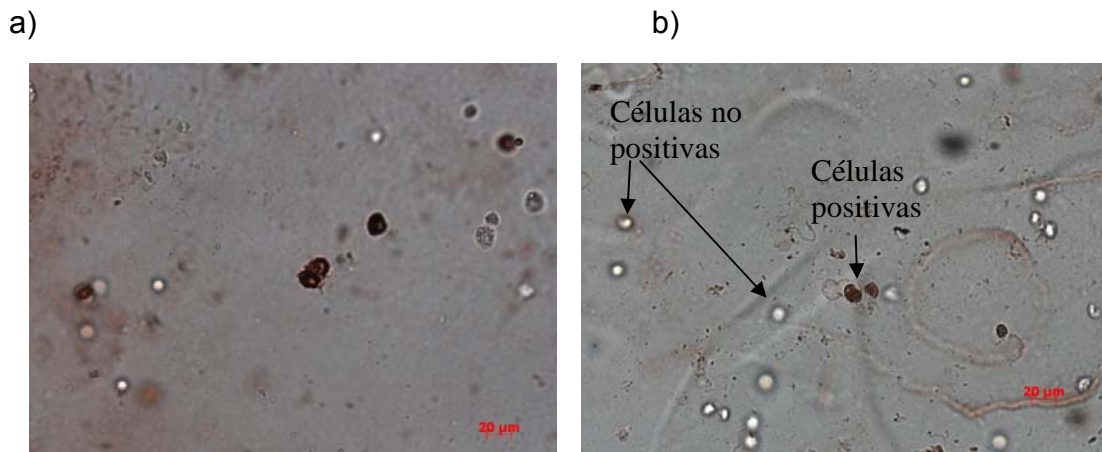
El comportamiento de los dos tipos células en general fue positivo con respecto a los marcadores de diferenciación, lo que indica que el medio en el que fueron encapsuladas no afectó la conducta de fibroblastos y tampoco la conducta de las células de musculo liso arterial.

**3.2.2. Colágeno** Para las células en estudio el colágeno producido es de tipo I, por lo tanto su presencia fue corroborada con los ensayos histológicos de tinción usando anticuerpos de colágeno tipo I, marcadores exclusivos para este tipo de fibra.

En las imágenes mostradas en la Figura 17 de los hidrogeles que contenían los fibroblastos con Alginato como aditivo (Figura 17 a) se puede notar el tinción de más células que para los hidrogeles de ácido hialuronico de bajo peso molecular (Figura 17 b), corroborando de esta forma los resultados obtenidos en los análisis bioquímicos de colágeno.

También se observa que el número de fibroblastos contenidos en la sección tomada del hidrogel con ácido hialuronico de bajo peso molecular (Figura 17 b) es mayor que los fibroblastos contenidos en el hidrogel con alginato (Figura 17 a).

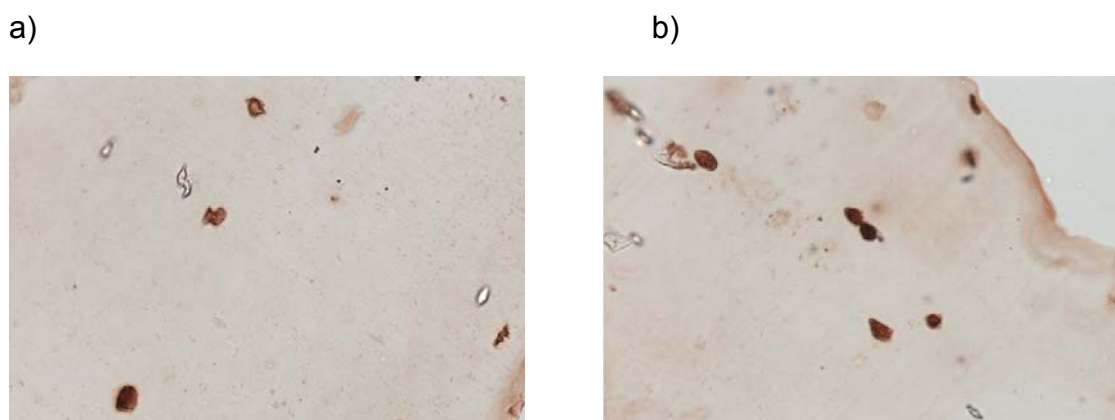
Figura 17. Las imágenes corresponden a los resultados de los análisis histológicos de Colágeno tipo I para la tercera semana de los hidrogeles que contenían fibroblastos, a) Alginato, b) Ácido hialuronico de bajo peso molecular.



Para los hidrogeles que contienen las células de musculo liso arterial, se observó que aquellos que tenían el Ácido hialuronico de bajo peso molecular presentaron la menor cantidad de células marcadas positivamente (Figura 18 a).

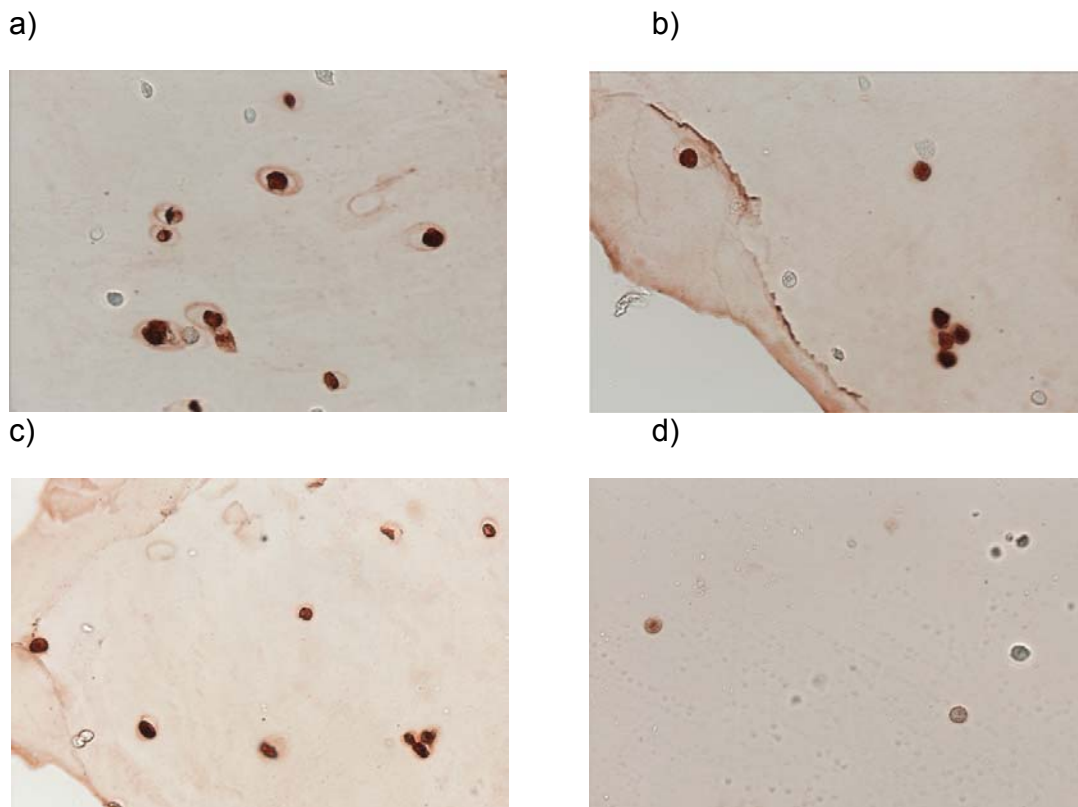
Los hidrogeles con Dermatan sulfato y Condroitin sulfato mostraron una cantidad ligeramente inferior de células marcadas en comparación con los hidrogeles que contenían Heparin sulfato en el cual se observó la mayor cantidad de células marcadas positivamente (Figura 18 b). Lo que confirma lo mostrado en los análisis bioquímicos.

Figura 18. Las imágenes corresponden a los resultados de los análisis histológicos de Colágeno tipo I para las células de musculo liso arterial a las dos semanas de cultivo, a) hidrogeles con Ácido hialuronico de bajo peso molecular, b) hidrogeles con Heparin sulfato

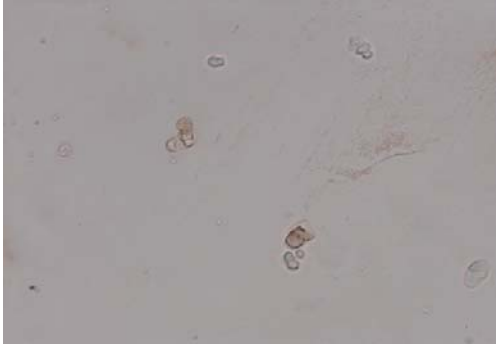


**3.2.2. Elastina** Los ensayos semi-cuantitativos se realizaron para las células de musculo liso arterial debido a que con el ensayo bioquímico para elastina no se tuvieron resultados veraces para este tipo de células, entonces, con los resultados obtenidos del conteo de células marcadas y no marcadas se hizo una gráfica con el porcentaje de células positivas (Figura 20) en cada sección haciendo posible la comparación entre los glucosaminoglucanos utilizados. En cada uno de los tiempos de cultivo se obtuvieron imágenes como las de la Figura 19. En esta figura, las imágenes a, b y c muestran una mayor cantidad de células marcadas positivamente indicando que estos hidrogeles (Condroitin sulfato, ácido hialuronico y Dermatan sulfato) presentan un ambiente mas propicio para la producción de elastina.

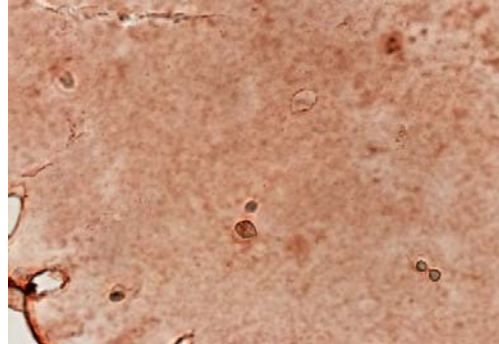
Figura 19. Las imágenes corresponden a los resultados de los análisis histológicos de Elastina para las células de musculo liso arterial, a) Condroitin sulfato a 35 días, b) Ácido hialuronico de bajo peso molecular a 35 días, c) Dermatan sulfato a 35 días, d) Condroitin sulfato a 14 días, e) Heparin sulfato a 14 días y f) Dermatan sulfato a 14 días.



e)

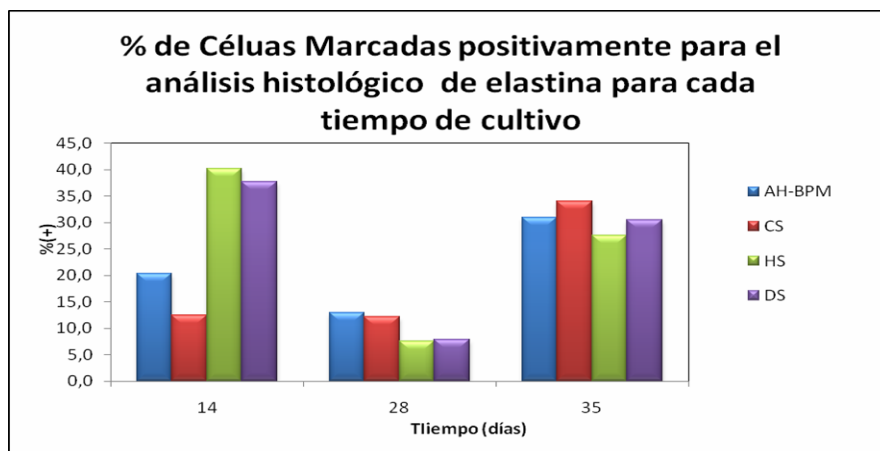


f)



En las imágenes d, e y f de la Figura 19 se observa ruido y a demás las células marcadas positivamente no son tan claras como en las primeras imágenes.

Figura 20. % de células marcadas positivas a los análisis histológicos de Elastina para las células de musculo liso arterial durante el tiempo de cultivo, Ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM), Condroitin sulfato (CS), Heparin Sulfato (HS) y Dermatan sulfato (DS)



En la Figura 20 se observa que en los dos últimos tiempos de muestreo hay una tendencia creciente de producción de elastina, siendo el Condroitin sulfato y el ácido hialuronico de bajo peso molecular los hidrogeles que presentan un mayor numero de células marcadas positivamente, seguidos muy cercanamente por los hidrogeles restantes (Heparin sulfato y Dermatan sulfato).

Para el primer tiempo de muestreo se ve claramente que las medidas son discordantes (Figura 20), ya que no es lógico pensar que después de tener una

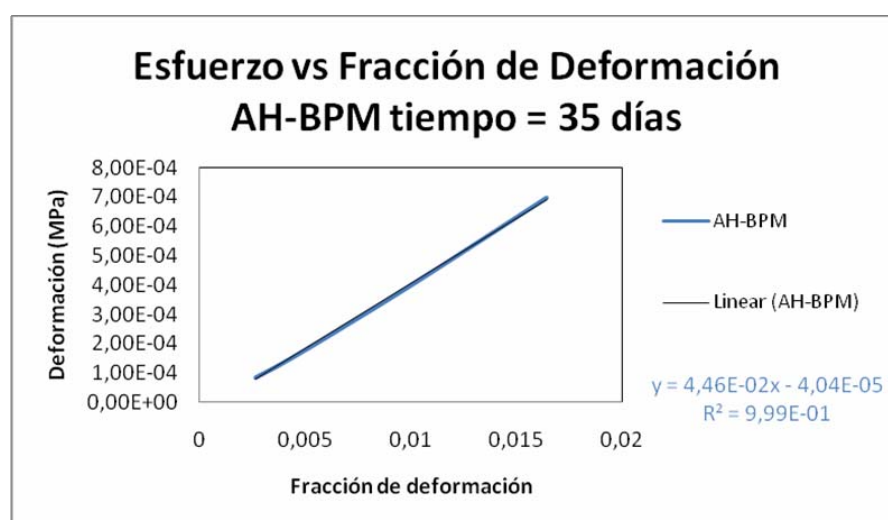
alta producción se tenga un decaimiento brusco y finalmente un gran aumento, teniendo en cuenta que las células en estos hidrogeles permanecieron aproximadamente constantes durante todo el tiempo de cultivo. Dicha discordancia se puede explicar con las imágenes d, e y f de la Figura 19. donde se muestra ruido en las imágenes de los ensayos histológicos, células débilmente tinturadas, o ambas, lo que implica errores en estos primeros conteos. Caso que no sucedió para los otros tiempos ya que la técnica había sido perfeccionada.

### 3.3 PRUEBAS MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles fueron evaluadas usando el método de Barrido de esfuerzos, en modo de compresión. Esta prueba realizada bajo esfuerzos periódicos es la más indicada para los tipos de tejidos en estudio, debido a que estos tejidos se encuentran sometidos a esfuerzos periódicos que desgastan.

Para determinar el módulo de Young (E) se graficaron los resultados, obtenidos por el equipo de análisis dinámico-mecánico, de esfuerzo (MPa) contra la fracción de la deformación, para cada hidrogel en cada tiempo de cultivo.

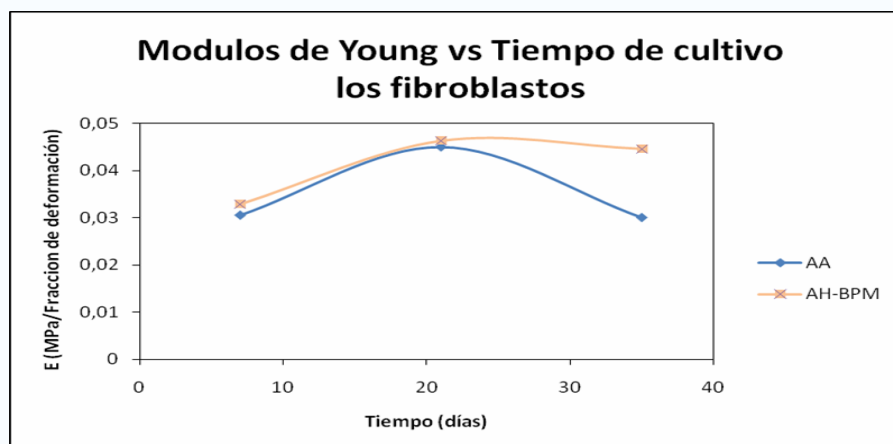
Figura 21. Cálculo del módulo de Young por regresión lineal de la curva Esfuerzo vs Deformación hidrogel con ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM) que contenía fibroblastos



La Figura 21. Muestra la curva Esfuerzo contra Deformación obtenida para el hidrogel que contenía los fibroblastos, con Ácido hialuronico de bajo peso molecular, al día 35 de cultivo. Esta curva se realizó para todos los hidrogeles en todos los tiempos, con el objetivo de obtener los módulos de Young, estos se obtuvieron haciendo regresión lineal y tomando el valor de la pendiente de cada curva para todos los hidrogeles.

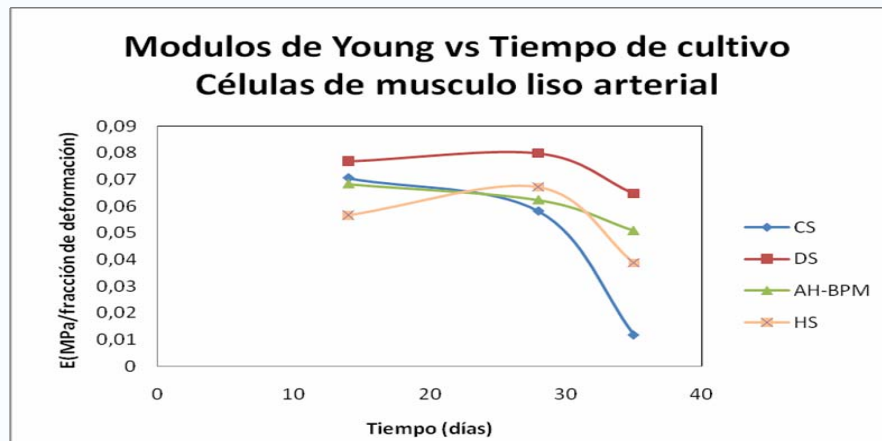
Obtenidos los módulos de Young se graficaron contra el tiempo para cada tipo de células obteniéndose los siguientes resultados:

Figura 22. Comparación del módulo de Young contra el tiempo para los hidrogeles que contenían los fibroblastos, Alginato (AA), Ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM).



En la Figura 22 se observa que los módulos de Young de los hidrogeles con ácido hialuronico de bajo peso molecular son mayores, incrementan en los primeros días de cultivo y luego tienden a estabilizarse, muy probablemente debido a la viscosidad que este aditivo le proporciona al hidrogel. El comportamiento observado por los hidrogeles con Alginato es creciente hasta el día 21 de cultivo, pero luego decrece significativamente lo anterior puede ser explicado con el incremento en la producción de elastina de las células de este hidrogel (ver Figura 14).

Figura 23. Comparación del módulo de Young contra el tiempo para los hidrogeles que contienen las células de musculo liso arterial, Ácido hialuronico de bajo peso molecular (AH-BPM), Condroitin sulfato (CS), Heparin Sulfato (HS) y Dermatan sulfato (DS)



Para los hidrogeles que contenían las células de musculo liso arterial se observa en la Figura 23 que los módulos de Young para los hidrogeles con Dermatan sulfato son superiores a los demás hidrogeles, los hidrogeles con ácido hialuronico de bajo peso molecular presentaron un decremento en el módulo de Young con respecto al tiempo aproximadamente constante (lineal), por el contrario, los hidrogeles de Heparin sulfato presentan un comportamiento muy variable de los módulos de Young con respecto al tiempo. Finalmente, observando los hidrogeles que contenían Condroitin sulfato se nota que existe el mayor decremento de los módulos de Young con respecto al tiempo, lo que muestra que el material adquiere mayor elasticidad durante el tiempo de cultivo.

De los gráficos anteriores se puede resaltar que los hidrogeles que tuvieron una producción mayor de elastina presentan una disminución en el módulo de Young con el tiempo, encontrando que con menores esfuerzos se producirán mayores deformaciones, propiedad que para las aplicaciones esperadas, reconstrucción de cuerdas vocales y de arterias, tiene gran importancia. Para un paciente con reconstrucción de las cuerdas vocales es importante proveerle de un material con propiedades altamente elásticas con el fin de reducir la presión de fonación

durante el tratamiento post operatorio del manejo del implante. También es importante que el material que se utilice para el remplazo de las arterias posea cualidades elásticas ya que las arterias humanas (especialmente del arco aórtico) deben sobrevivir en promedio más de 60 años, soportando miles de millones de ciclos de extensión-relajación.

## CONCLUSIONES

Según los criterios de diseño para implantes son necesarias dos cosas: que exista un número apreciable de células en el tejido sintético y que estas produzcan una buena cantidad de componentes de la matriz extracelular, bajo esta premisa se llegó a las siguientes conclusiones:

- ✓ Se observa que los hidrogeles de Alginato en los que se encapsularon los fibroblastos son el mejor material para la reconstrucción de cuerdas vocales en comparación a los de ácido hialurónico (de alto y bajo peso molecular) porque aunque presentó la mayor pérdida de células, su síntesis de componentes de la matriz extracelular fue alta en comparación con los de ácido hialurónico. Esta producción es importante debido a que las cantidades existentes en la normal Lamina Propia humana son altas, sobre todo en colágeno tipo I (Composición Bioquímica Humana en LP: 1,5-2% GAG, 40-45% Colágeno y 4-10% de Elastina).
- ✓ La alta producción de elastina que presentó el hidrogel con Alginato es de gran importancia porque ésta le confiere al material buenas propiedades elásticas, característica clave para los materiales que se quieran implementar en la reconstrucción de cuerdas vocales ya que por anatomía las cuerdas vocales son sometidas a altos impactos mayores a 100 veces por segundo.
- ✓ La viscosidad que le infiere el ácido hialurónico a los hidrogeles que contienen los fibroblastos, hacen que este material manifieste un módulo de Young superior a los hidrogeles de Alginato y también permite mayor retención de células dentro del hidrogel durante el tiempo de cultivo.

- ✓ El material mas adecuado para el cultivo de las células de musculo liso arterial es el hidrogel que contenía Condroitin sulfato. Este glucosaminoglucano presentó una buena producción de colágeno y tuvo la mejor síntesis de elastina, lo cual es sumamente importante ya que en el tejido nativo estas células deben estar inmersas en una densa red de colágeno y elastina.
- ✓ El ácido hialuronico de bajo peso molecular parece inhibir la síntesis de colágeno, porque como se observa para ambos tipos de células, siempre presentó una diferencia significativa con respecto a los demás hidrogeles (ver Figuras 12 y 13).
- ✓ Los hidrogeles con Heparin sulfato donde fueron encapsuladas las células de musculo liso arterial presentaron bajos niveles de elastina y altos niveles de colágeno, de lo cual se puede inferir que la región límite entre la lamina media y la interior de la arteria aorta posee esta misma distribución de fibras de colágeno y elastina ya que el Heparin sulfato es el principal polisacárido de esta región.
- ✓ En los hidrogeles con Condroitin sulfato se exhibe una alta producción de elastina de donde se deduce que este glucosaminoglucano juega un papel importante en la producción de elastina en el tejido nativo teniendo en cuenta que este se encuentra fuertemente presente en la lamina elástica (subcapa de la lamina media).
- ✓ La rigidez mecánica de los hidrogeles de ácido hialuronico, en general, son favorables para la inmovilización de células y aplicaciones de encapsulación ya que este tipo de matriz provee protección a deformaciones y esfuerzos externos.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Mejorar el diseño de las barras que se utiliza para sostener de los hidrogeles, con el fin de aumentar el contacto con el antibiótico y así evitar contaminaciones, porque fue en esta zona donde se detectó la posible contaminación (ver Anexo II, pág. 48).
- ✓ Preparar suficiente solución polimérica ya que esta al ser filtrada se pierde en el filtro de jeringa.
- ✓ Practicar los ensayos de immunostaining para evitar ruido y muestras inútiles al momento de tomar datos.
- ✓ Limpiar los platos de pozos antes de realizar las lecturas porque pueden tener polvo que interfiera en el momento de las lecturas.
- ✓ Futuros estudios pueden ser enfocados en la variación de la concentración del polisacárido con el cual se obtuvieron mejores resultados para la optimización del material.
- ✓ Realizar investigación con estos materiales en formas que simulen los tejidos a reconstruir, diseño tridimensional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Branski R.C., Verdolini K., Sandulache V., Rosen C.A., Hebda P.A. "Vocal Fold Wound Healing: A Review for Clinicians" *Journal of Voice* **2006** 20(3), 432-442
2. Benninger M.S., Alessi D., Archer S., Bastian R., Ford C., Koufman J., Sataloff R., Spiegel J.R., Woo P. "Vocal Fold Scarring: Current Concepts and Management" *Otolaryngol Head Neck Surg.* **1996** 115(5), 474-482
3. Hansen J.K., Thibeault S.L. "Current Understanding and Review of the Literature: Vocal Fold Scarring" *Journal of Voice* **2004** 20(1), 110-120
4. Hirano S. "Current Treatment of Vocal Fold Scarring" *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **2005** 13, 143-147
5. *Voice Disorders: Vocal Fold Scarring* 2004, from <http://www.voiceproblem.org/disorders/vfscarring/index.asp>
6. Dialely S.H., Ford C.N. "Surgical Management of Sulcus Vocalis and Vocal Fold Scarring" *Otolaryngol Clin N Am* 39 (**2006**) 23 - 42
7. Fujia T.J., Ostrem E.M., Probst-Fuja M.N., Titze I.R. "Differential Cell Adhesion to Vocal Fold Extracellular Matrix Constituents" *Matrix Biology* **2006** 25, 240-251
8. Catten M., Gray S.D., Hammond T.H., Zhou R., Hammond E. "Analysis of Cellular Location and Concentration in Vocal Fold Lamina Propria" *Otolaryngol Head Neck Surg.* **1998** 118(5), 663-7
9. Kriesel K., Thibeault S.L., Chan R.W., Suzuki T., Van Groll P.J., Bless D.M., "Treatment of Vocal Fold Scarring: Rheologic and Histologic Measures Using Homologous Collagen Matrix in a Rabbit Model" *Ann Otol Rhinol Laryngol* **2002** 113, 777-785
10. Bjorck G., D'Agata L., Hertegard S. "Vibratory Capacity and Voice Outcome in Patients with Scarred Vocal Folds Treated with Collagen Injections-Case Studies" *Logoped Phoniatr Vocol.* **2002** 27, 4-11
11. Neuenschwander M.C., Sataloff R.T., Abaza M.M., Hawkshaw M.J., Reiter D.,

- Spiegel J.R. "Management of Vocal Fold Scar with Autologous Fat Implantation: Perceptual Results" *Journal of Voice* **2001** 15, 295-304
12. Hsiung M.W., Woo P., Minasian A., Schaefer Mojica J. "Fat Augmentation for Glottic Insufficiency" *Laryngoscope* **2000** 110, 1026-1033
13. Hertegard S., Dahlgvist A., Goodyer E. "Viscoelastic measurements after vocal fold scarring in rabbits--short-term results after hyaluronan injection" *Acta Otolaryngol.* 2006 126(7), 758-63.
14. Hertegard S., Hallen L., Laurent C., Lindstrom E., Olofsson K., Testad P., Dahlgvist A "Cross-linked Hyaluronan Used as Augmentation Substance for Treatment of Glottal Insufficiency: Safety Aspects and Vocal Fold Function" *Laryngoscope* **2002** 112, 2211-2219
15. Hirano S., Bless D.M., Nagai H., Rousseau B., Welham N.V., Montequin D.W., Ford C.N. "Growth Factor Therapy for Vocal Fold Scarring in a Canine Model" *Ann Otol Rhinol Laryngol* **2004** 113, 777-785
16. Langer R., Vacanti J.P. "Tissue Engineering" *Science* **1993** 260, 920-926
17. Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J., Vacanti J.P. "Microscale Technologies for Tissue Engineering and Biology" *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006** 103(8), 2480-2487
18. Rekow D. "Informatics Challenges in Tissue Engineering and Biomaterials" *Adv Dent Res.* **2003** 17, 49-54.
19. Hahn M.S., Teply B.A., Stevens M.M., Zeitels S.M., Langer R. "Collagen Composite Hydrogels for Vocal Fold Lamina Propria Restoration" *Biomaterials* **2006** 27, 1104-1109
20. Kanemaru S., Nakamura T., Omori K. Kojima H., Magruffov A., Hiratsuka Y., Hirano S., Ito J., Shimizu Y. "Regeneration of the Vocal Fold Using Autologous Mesenchymal Stem Cells" *Ann Otol Rhinol Laryngol* **2003** 112, 915-920
21. Webb K., Li W.H., Hitchcock R.W., Smeal R.M., Gray S.D., Tresco P.A. "Comparison of human fibroblast ECM-related gene expression on elastic three-dimensional substrates relative to two-dimensional films of the same material" *Biomaterials* **2003** 24, 4681-4690

22. Mann, B.K.; Gobin, A.S.; Tsai, A.T.; Schmedlen, R.H.; West, J.L. "Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering" *Biomaterials* **2001** 22, 3045-3051
23. Elbert, D.L.; Hubbell, J.A. "Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering" *Biomacromolecules* **2001** 2, 430-441
24. Bryant S.J., Anseth K.S., Lee D.A., Bader D.L. " Crosslinking Density Influences the Morphology of Chondrocytes Photoencapsulated in PEG Hydrogels During the Application of Compressive Strain" *Journal of Orthopaedic Research* **2004** 22, 1143-1149
25. Bryant S.J., Anseth K.S. "Hydrogel Properties Influence ECM Production by Chondrocytes Photoencapsulated in Poly(ethylene glycol) Hydrogels" *J Biomed Mater Res.* **2002** 59(1), 63-72
26. Peyton S.R., Raub C.B., Keschrums V.P., Putnam A.J. "The Use of Poly(ethylene glycol) Hydrogels to Investigate the Impact of ECM Chemistry and Mechanics on Smooth muscle cells" *Biomaterials* **2006** 27, 4881-4893
27. Cruise G.M., Scharp D.S., Hubbell J.A. "Characterization of Permeability and Network Structure of Interfacially Photopolymerized Poly(ethylene glycol) Diacrylate Hydrogels" *Biomaterials* **1998** 19, 1287-1294
28. Greogy TR., "Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals". *Genome* 2000;43:895-901.
29. Kim B-S., Mooney D.J. "Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering" *Tibtech* May 1998 (Vol. 16).
30. Masters K.S., Shah D.N., Leinwand L.A., Anseth K.S. "Crosslinked hyaluronan scaffolds as a biologically active carrier for valvular interstitial cells" *Biomaterial* 26 (2005) 2517 – 2525.
31. Smeds K.A., Grinstaff M.W. "Photocrosslinkable polysaccharides for *in situ* hydrogel formation" *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol 54, 115-121 (2001)

32. Anseth K.S., Bowman C.N., Peppas L.B. "Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination" *Biomaterials* 17 (1996) 1647 – 1657.
33. Stock U.A., Vacanti J.P. "Tissue Engineering: Current State and Prospects" *Annu. Rev. Med.* 52:443-51 (2001).
34. Hahn M.S., McHale M.K., Wang E., Schmedlen R.H., West J.L. "Physiologic Pulsatile Flow Bioreactor Conditioning of Poly(ethylene glycol)-based Tissue Engineered Vascular Grafts" *Annals of Biomedical Engineering* (2006).
35. Klinger R.Y., Niklason L.E., "Culture of Cells for Tissue Engineering" *WILEY-LISS* (2006) 296-297.
36. Abberton K.M. Healy D.L. and Rogers P.A.W. "Smooth muscle alpha actin and myosin heavy chain expression in the vascular smooth muscle cells surrounding human endometrial arterioles" *Human Reproduction* Vol. 14 No. 12 PP. 3095-3100 (1999).
37. Jackson R.L., Busch S.J. and Cardin A.D. "Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and Role in Physiological Processes" *Physiological Reviews* Vo. 71, No. 2, April 1991 USA

# Anexos

## ANEXO I REACTIVOS PREPARADOS

### **“PH6 Buffer” para uso en la solución de Chloramine T**

*(Puede ser preparada y almacenada durante 3 meses a temperatura ambiente)*

1. Disolver los siguientes reactivos en Disolver 16.6mL diH<sub>2</sub>O
  - a. 1.12g Hidróxido de Sodio
  - b. 1.6g Acido cítrico mono hidrato
  - c. 4g Citrato de sodio trihidrato
  - d. 0.4ml Ácido acético glacial

Cuando se disuelvan, mida el volumen de la solución con una pipeta y adicione más di-H<sub>2</sub>O para llevar el volumen a 33.3mL

2. Adicione 10mL de isopropanol usando una pipeta de vidrio y 6.67mL diH<sub>2</sub>O. Mezcle bien. Lleve el pH de la solución a 6 con HCl
3. Tape y envuelva esta solución con parafina.

### **“Chloramine-T”**

*(Usar fresco con máximo dos días antes del ensayo)*

1. Disuelva 0.088g de Chloramine-T (Fischer Chemical) en 5mL “pH6 buffer” y 0.625mL isopropanol.
2. Agite hasta disolver completamente.
3. Tape y envuelva esta solución con parafina.

### **“p-DMBA”**

*(Usar fresco con máximo dos días antes del ensayo)*

1. En un vial de 20mL de vidrio cubierto con papel aluminio, adicione
  - a. 1.25g p-Dimethylbenzaldehyde (Sigma)
  - b. 5ml isopropanol
  - c. Barra de agitación magnética.
2. En una cabina de extracción de gases, mientras la solución es agitada, agrega 2.17mL de 60% Acido perclórico (pipeta de vidrio). Permita que la

mezcla se agite por 10 min. Tape y envuelva con parafina.

3. Úselo después de una hora.

#### **“Hydroxiprolina estándar (10mg/ml)”**

1. Disolver 10mg of trans-4hydroxiprolina-L (Fluka) en 1mL de diH<sub>2</sub>O agite hasta disolver completamente.
2. Alícuota y almacenar a -80°C.

#### **“1X TE buffer de trabajo”**

1. Diluya el 10 X TE buffer 10 veces con diH<sub>2</sub>O
2. Almacene a temperatura ambiente.

#### **“PicoGreen reactivo de trabajo”**

*(Usar justo después de ser preparado)*

1. Permita que el PicoGreen alcance temperatura ambiente antes de abrir el vial.
2. En un tubo cónico de 15mL, haga una dilución de 200 veces con 1X TE buffer de PicoGreen. Por ejemplo para un ensayo con 20 muestras adiciones 100µL de PicoGreen en 19.9mL de 1X TE buffer.
3. Cubra el tubo con papel aluminio para proteger de la luz.

#### **“Citrato de Sodio 0.1M pH 5”**

1. Disolver 28.41g Citrato de Sodio en 1L diH<sub>2</sub>O.
2. Llevar a pH a 5 con 1N HCl.

#### **“HBS”**

1. Disolver 1.19g de HEPES (HYCLONE) en 500mL de diH<sub>2</sub>O
2. Agregar 4.38g de NaCl (FISHER BIOTECH) a la anterior solución
3. Llevar el pH a 7.4 con 1N NaOH

**“Acetofenona al 1%”**

1. Disolver en un vial de 2mL 300mg de 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone en 1ml de 1-vinyl-2-pyrrolidinone (ALDRISH)
2. Cubra el vial con papel aluminio para proteger de la luz.
3. Tape y envuelva con parafina.

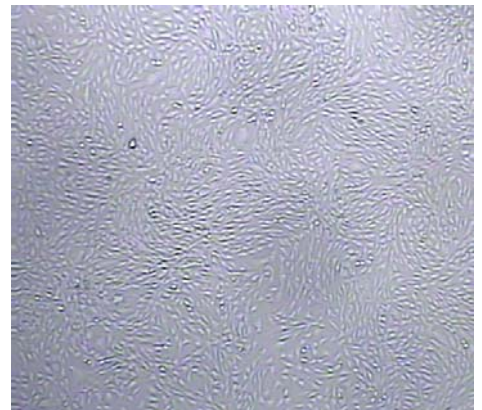
## ANEXO II IMÁGENES DE APOYO.



Pellet de células listas para encapsulación



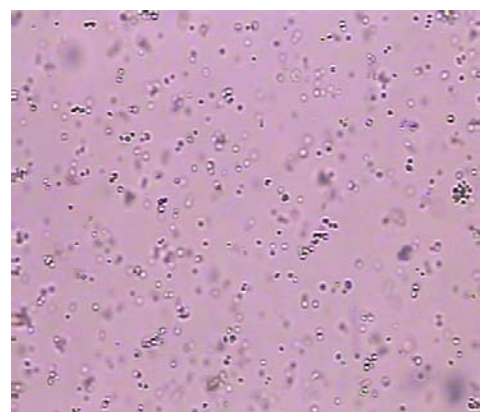
Cultivo de células en buenas condiciones



Cultivo de Células en confluencia



Incubadora de cultivo con control de CO<sub>2</sub> y Temperatura



Células Encapsuladas en un Hidrogel de PEGDA



Microscopio Axiovert 200 M



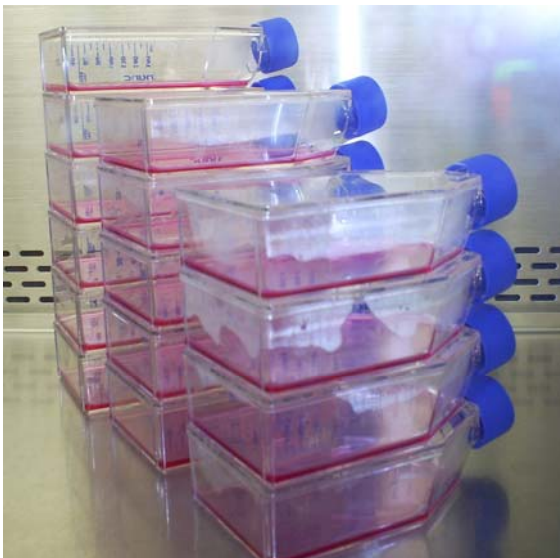
Montaje para la polimerización



Plato Utilizado para las lecturas de Colágeno y Elastina.



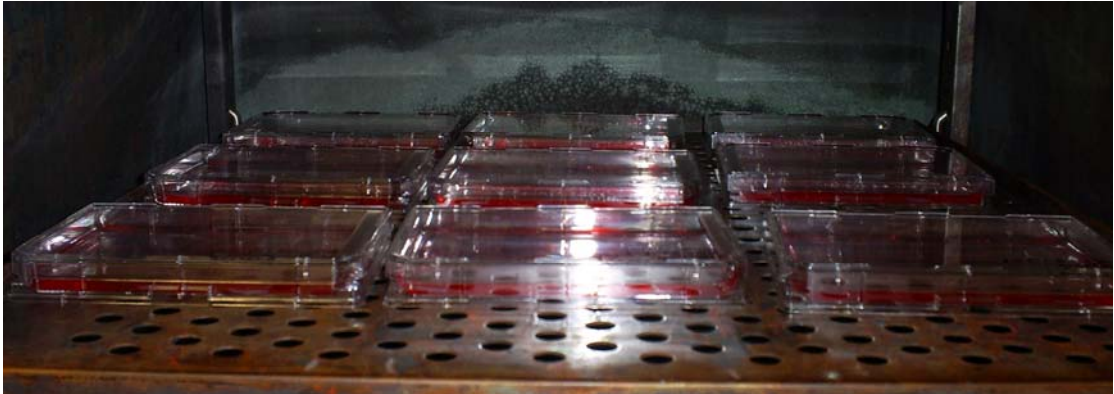
Plato Utilizado para las lecturas de ADN



Frascos utilizados para cultivar Células.



Equipo para realizar la prueba de Compresión



Cultivo de Hidrogeles



Hood de flujo laminar con luz UV.



Tanque de Nitrógeno para Criopreservacion Celular.



Lámpara de luz UV.



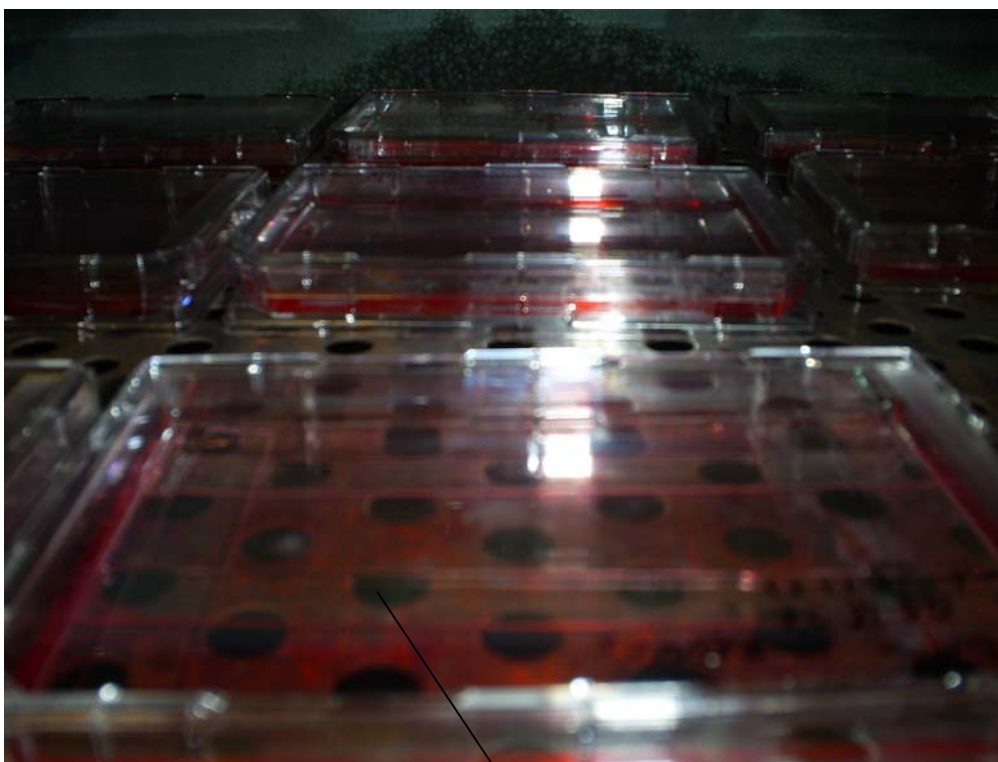
Equipo utilizado para análisis Bioquímicos. Bio Tek Synergy (Synergy Multi-Detection Microplate Reader, Fisher Scientific)



Cortador de Secciones para Análisis Histológicos (Cryo cut 1800, jung 1800, Hystotronic Inc. Leica, vista lateral)



Cortador de Secciones para Análisis Histológicos (Cryo cut 1800, jung 1800, Hystotronic Inc. Leica, vista superior)



Barra soporte del hidrogel  
en cultivo.