

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

Caracterización físico-química y biológica de filmes de quitosano como transportadores de la rhBMP-2 en la regeneración del tejido óseo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Fátima Civantos Fernández

Directores

José Luis López Lacomba
Viviana Ramos Lino

Madrid, 2014



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR II**



**CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y BIOLÓGICA
DE FILMES DE QUITOSANO COMO TRANSPORTADORES
DE LA rhBMP-2 EN LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO**

**Memoria de Tesis Doctoral
Ana Civantos Fernández**

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE FILMES DE
QUITOSANO COMO TRANSPORTADORES DE LA rhBMP-2 EN LA
REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO.**

MEMORIA PRESENTADA POR

ANA FATIMA CIVANTOS FERNÁNDEZ

**PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Bajo la dirección de los Doctores:

Jose Luis López Lacomba

Viviana Ramos Lino

MADRID, 2014

INFORME DE LOS DIRECTORES

El Dr. Jose Luis López Lacomba, Profesor Titular del Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, director del Instituto de Estudios Biofuncionales y director responsable del grupo de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Complutense de Madrid.

La Dra. Viviana Ramos Lino, Responsable Técnico de la empresa Noricum S.L. y miembro del Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la Licenciada Dña. Ana Fátima Civantos Fernández ha realizado la labor investigadora correspondiente a la Tesis Doctoral titulada “Caracterización físico-química y biológica de filmes de quitosano como transportadores de la rhBMP-2 en la regeneración de tejido óseo” bajo su dirección en el Instituto de Estudios Biofuncionales y reuniendo los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizan su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente nombrado a tal efecto. Y para que conste, a los efectos oportunos, firman el presente documento.

Madrid, 5 de mayo de 2014

Dr. Jose Luis López Lacomba

Dra. Viviana Ramos Lino

ÍNDICE

ÍNDICE	3
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS	13
I. INTRODUCCIÓN	
1. INGENIERÍA DE TEJIDOS	19
1.1 INTRODUCCIÓN	19
1.2 COMPONENTES BÁSICOS EN LA TE	20
1.2.1 Células	20
1.2.2 Factores Bioactivos	21
1.2.3 Biomateriales	26
2 QUITOSANO	29
2.1 INTRODUCCIÓN	29
2.2 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA	33
2.3 DEGRADACIÓN DEL QUITOSANO	36
2.3.1 Degradación enzimática vía quitosanasas	36
2.3.2 Degradación enzimática vía lisozima	37
2.3.3 Degradación química	40
2.4 BIOCMPATIBILIDAD Y TOXICIDAD	40
2.5 APLICACIONES GENERALES	41
3 SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	45
3.1 INTRODUCCIÓN	45
3.2 APLICACIONES DE FILMES DE QUITOSANO EN BIOMEDICINA	47
4 REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO	49
4.1 INTRODUCCIÓN	49
4.2 CARACTERÍSTICAS, COMPONENTES Y FUNCIONES	49
4.2.1 Estructura macroscópica	50
4.2.2 Estructura microscópica	52
4.2.3 Remodelación ósea	55
4.2.4 Reparación o consolidación ósea	57
4.3 EXPERIMENTACION <i>IN VITRO</i> EN LA REGENERACIÓN ÓSEA	59
4.4 EXPERIMENTACIÓN IN VIVO EN LA REGENERACIÓN ÓSEA	62

4.5 TÉCNICAS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DE TEJIDO ÓSEO IN VIVO	64
4.6 BIODISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA rhBMP-2	65
II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	73
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. REACTIVOS	77
2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL MATERIAL DE PARTIDA	77
2.1 DESCRIPCIÓN VISUAL	77
2.2 TAMAÑO DE PARTÍCULA	77
2.3 CONTENIDO DE HUMEDAD	77
2.4 CONTENIDO DE CENIZAS	77
2.5 CONTENIDO DE INSOLUBLES	78
2.6 CONTENIDO DE METALES PESADOS	78
2.7 ANÁLISIS ELEMENTAL	78
2.8 PESO MOLECULAR	79
2.9 GRADO DE DESACETILACIÓN	79
2.10 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	80
2.11 VISCOSIDAD ROTACIONAL	81
2.12 VISCOSIDAD INTRÍNSECA	81
3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMES DE QUITOSANO	81
3.1 PREPARACIÓN DE FILMES DE QUITOSANO	81
3.2 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS DE LOS FILMES	82
3.3 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	82
3.4 DETERMINACIÓN DE LA RUGOSIDAD	83
3.5 DETERMINACIÓN DEL ESPESOR	83
3.6 DETERMINACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO	83
3.7 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRATACIÓN	83
4. ENSAYOS DE LA DEGRADACIÓN DE QUITOSANO	84
4.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE QUITOSANO	84
4.2 DEGRADACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE QUITOSANO	84
4.3 DEGRADACIÓN DE LOS FILMES DE QUITOSANO	84
4.4 DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA SOLUCIÓN Y DE LOS FILMES	85

5. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	85
5.1 PREPARACIÓN DE FILMES DE QUITOSANO	85
5.2 LÍNEA CELULAR C2C12	85
5.3 ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR	86
5.3.1 Contenido total de proteínas totales (Ensayo de Bradford)	86
5.3.2 Determinación de la actividad metabólica I (Ensayo de MTS)	87
5.3.3 Determinación de la actividad metabólica II (Ensayo de Alamar blue)	87
5.3.4 Determinación de la ALP (Ensayo de diferenciación)	87
5.3.5 Tinción del citoesqueleto celular (Inmunocitoquímica directa)	88
5.4 LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA rhBMP-2 DESDE FILMES	88
6 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	89
6.1 PREPARACIÓN DE FILMES DE QUITOSANO	89
6.2 CIRUGÍA EXPERIMENTAL	89
6.3 TRATAMIENTO HISTOLÓGICO	90
6.3.1 Tinción de Hematoxilina Eosina (HE)	90
6.3.2 Tinción Tricrómico de Masson (TCM)	90
6.4 TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA	91
6.5 BIODISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA	91
6.5.1 Proteína marcada	91
6.5.2 Preparación de filmes con y sin proteína marcada con ¹²⁵I	92
6.5.3 Cirugía experimental	92
6.5.4 Tratamiento de las muestras. Diseño de la MARG	92
7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	93
 IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. CARATERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS QUITOSANOS DE PARTIDA	97
2. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS FILMES DE QUITOSANO	104
3. DEGRADACIÓN ACIDA Y ENZIMÁTICA DEL QUITOSANO	116
4. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS FILMES: ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	133
5. ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE rhBMP-2 DESDE FILMES <i>IN VITRO</i>	165
5.1 LIBERACIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	166
5.2 LIBERACIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE QUITOSANO	175
5.3 INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DEL QUITOSANO	179

6. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS FILMES: ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	184
6.1 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE FILMES DE QUITOSANO Y FORMACIÓN DE HUESO	185
6.1.1 Degradación de un filme en función del tiempo	186
6.1.2 Degradación de diferentes quitosanos a 42 días	193
6.1.3 Actividad osteoinductora de hueso ectópico de filmes con rhBMP-2	194
6.2 SEGUIMIENTO DE LA FORMACIÓN DE HUESO ECTÓPICO MEDIANTE TÉCNICAS NO INVASIVAS	197
6.2.1 Liberación de diferentes concentraciones de proteína	197
6.2.2 Liberación desde diferentes filmes de quitosano	202
6.3 ESTUDIO DE LA BIODISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA DESDE FILMES <i>IN VIVO</i>	204
V. CONCLUSIONES	215
VI. BIBLIOGRAFÍA	221
ÍNDICE DE TABLAS	247
ÍNDICE DE FIGURAS	248
ANEXO I	257
ANEXO II	260

ABSTRACT**INTRODUCTION**

Current approaches for bone regeneration such as autografts (bone tissue implants from same patient) and allografts (from different patient) face important drawbacks, limited tissue supply, increase surgical time or risk of immune rejection (in allografts option) (Burg *et al.*, 2002). In order to resolve these limitations bone tissue engineering has been focused in the development of new bone graft substitutes which incorporates the combination of cells precursor, biochemical factors and scaffolds, to promote wound healing and restore bone function (Caplan, 2000).

The most important growth factors with potential for bone regeneration are the bone morphogenetic proteins (BMPs). Members of the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily they have been frequently used because they stimulate cellular proliferation, migration and differentiation to osteoblastic lineage. Recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) is potentially a useful activation factor for bone repair, which can induce ectopic bone formation (López-Lacomba *et al.*, 2006). Due to its high renal clearance and fast diffusion from tissues BMPs need to be delivered in localized sites in order to repair bone defects and nonunions (Lo *et al.*, 2012).

Chitosan has been widely applied in drug delivery, gene therapy and tissue engineering due to its biocompatibility, biodegradability and nontoxic effect (Kumar *et al.*, 2004; Aranaz *et al.*, 2009). It is a natural polysaccharide comprising copolymers of glucosamine with N-acetylglucosamine that can be obtained by alkaline N-deacetylation of chitin, the second most abundant natural polymer after cellulose. It is structurally similar to glycosaminoglycans (GAGs) presented in bone matrix and it is biodegradable by lysozyme and other unspecific enzymes such as proteases and pectinases (Muzzarelli *et al.*, 2009). In addition, its excellent filmogenic properties and slow biodegradation rates make this biopolymer suitable to cover complex surfaces (as titanium implants) and acts as a carrier for bioactive molecules, to improve its osseointegration (Bumgardner *et al.*, 2003).

However, care must be taken to ensure that chitosan used is pure, as protein, metal or other contaminants to avoid any secondary effect in biomedical field. In order to develop an osteoinductive biodegradable chitosan films it is important to characterize the main physicochemical parameters that are going to affect its biological applications (López-Lacomba *et al.*, 2006). Even if it is structurally modify or derivatized to improve some characteristics, it is important to evaluate chitosan parameters that influence its biological activity like Molecular

weight (Mw) and Deacetylation degree (DD), defined as the percentage of NAG (*N acetyl glucosamine units*) in the polymer chain (Rinaudo, 2006).

MATERIALS AND METHODS

Following ASTM rules (Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue Engineered Medical Product Applications) we have acquired twelve chitosans from Biolog (Germany) and Primex (Norway) companies with two different chitin origins. The protein rhBMP-2 was gently supplied by Noricum S.L and radiolabelled rhBMP-2-¹²⁵I was purchased from Perking-Elmer. Chitosan samples were evaluated in humidity, ash, insoluble and heavy metals contents. Mw and DD were determined by viscosity measurements and spectroscopic techniques (¹HRMN). The obtained chitosan films by solvent casting solution in acetic acid 50 mM, were evaluated by microscopic techniques (Scanning Electronic Microscopy and Interometry Microscopy) to study surface morphology, thickness and roughness. Swelling behavior and contact angle measurements were also studied. Degradation kinetics was determined by viscosity measurements in different mediums, PBS (pH 7.4) and Acetate buffer (pH 5.4) with and without lysozyme.

In addition chitosan films were evaluated as cell biocompatibility surfaces (Bradford, MTS and Alamar Blue assays) using C2C12 premyoblastic cell line. Activated chitosan films with rhBMP-2 were also evaluated *in vitro* to determine cell differentiation (by ALP activity) and morphology cell studied was performed to actin cytoskeleton. Protein released was quantified by measurement of cell ALP content. *In vivo* experiments were performed using chitosan films (with and without protein) in Wistar rats by intramuscular pocket surgery. Biokinetic studies were performed in Wistar rats with radiolabelled protein during ten days and after them Macroautoradioluminography (MARG) was performed.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization results showed physicochemical parameters that are approved by different commercial chitosan companies to be used as TEMPs (Tissue Engineering Medical Products) highlighting a wide range of values of Mw (240 to 1300 KDa) and DD (73 to 95%).

On the other hand, homogeneous, transparent and reproducible chitosan films were obtained. Surface parameter results showed smoother surfaces and low thickness, directly proportional to polymer concentration. Chitosan films showed fast swelling rate, and stabilized at 60 minutes of being in contact with PBS. In acidic medium, films changes to a hydrogel state which lead on higher swelling levels. Contact angle substantiated chitosan surfaces as

hydrophilic and moderate hydrophilic surfaces being acceptable to use with cell experiments (Lieder *et al.*, 2012).

Moreover, *in vivo* chitosan was degraded by lysozyme. Degradation kinetics of chitosan samples were evaluated during 21 days using acetate acetic buffer pH 5.4 which correspond to pH of an inflammation process during wound healing in the *in vivo* conditions (Liu *et al.*, 2004). Results showed different patterns of degradation rates depending on its Mw and DD. The faster behavior was found in the highest DD sample (Q12). Polymer degradation kinetic performed *in vitro* was determined to be compatible with a second order kinetic.

In vitro tests revealed that chitosan films were) cell biocompatible to C2C12 line (Bradford, MTS and Alamarblue results) (Hirano *et al.*, 1999). Polymer films allow cell adhesion and proliferation with a similar behavior as TCP (tissue control Plastic treated for cell growth) reaching same metabolic activity with a delay of nearly one day. Highlighting this cell delay it started at the initial stages of cell adhesion. Cell density attached to chitosan surfaces at 4 hours of incubation was similar to control values but intermediate stages of adhesion process (spreading step), were taken too long. Cell morphology results by actin immunostaining showed this delay with a non-adherent round shape. Polymer concentration was inversely proportional to cell proliferation (Alamarblue results) and directly proportional to cell adhesion, due to increase in roughness. In addition, higher DD of chitosan films increase the number of cell interactions and produced an increase on cell proliferation, being Q12 the best cell proliferation surface (Freier *et al.*, 2005; Abarrategi *et al.*, 2008).

Released protein from chitosan films is due to confluence of different process, such as diffusion, swelling and degradation kinetics. C2C12 cells seeded on rhBMP-2 activated chitosan films showed levels of ALP (bone early cell marker) due to the rhBMP-2 in cell culture medium. Activated chitosan films showed a homogeneous cell growth behavior between chitosan and plastic control as consequence of protein released compared to films without protein (Lee *et al.*, 2004).

According to this premise, activated chitosan films were tested in *in vivo* models, using a simple surgery process by sample's implantation in intramuscular pockets. Chitosan films showed good biointegration, till it's completely extinction at 42 days of low Mw and low concentration chitosan films (Q11-0.25%). Activated ones with rhBMP-2 produced new bone tissue in accordance to its concentration. Furthermore active films showed good levels of protein release, keeping it active during more than 6 weeks at the organism and producing ectopic bone formation in rat's muscle since the second week post-surgery. These results were obtained through histological images (by Hematoxilin-Eosin and Masson Trichrome staining) and μ -CT.

Biokinetic studies results showed urinary and feces as the main excretion ways found out nose samples high levels of ^{125}I at 24hours post-surgery. Throughout whole body macroautoradiography (WBA) it was observed the retention sites of radiolabelled protein in different tissues and organs, highlighting grey signal in the implantation area confirming protein retain at site defect (Morcillo *et al.*, 2002; Legget, 2010).

CONCLUSIONS

This work demonstrates that it is possible to predict chitosan film behavior on *in vitro* and *in vivo* models based mainly on in its physicochemical parameters to a specific application. Chitosan films retain protein rhBMP-2 and controlled its release to maintain protein effect longer at surgical site avoiding high protein diffusion and subsequently its secondary effects. Chitosan films can be a high potential cover to different kind of biomaterials and control the delivery of different biomolecules, become an interesting biopolymer in tissue engineering field.

REFERENCES

Abarategi, A., Civantos, A., Ramos, V., Sanz Casado, J.V., López-Lacomba, J.L. (2008). Chitosan film as rhBMP2 carrier: Delivery properties for bone tissue application. *Biomacromolecules*, (9): 711-718.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, (3): 203-230.

Caplan, A.I. (2000). Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Engineering*, 6: 1-8.

Burg, K., Porter, S., Kellam, J.F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21: 2347-2359.

Hirano, H., Seino, Y., Akiyama, Y., Nonaka, Y. (1990). Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration, in: C.G. Gebelein and R.L. Dunn (Eds.), *Progress in Biomedical Polymers*, Plenum Press, New York, 283-289.

Kumar, M.M., Muzzarelli, R.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Dom, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104: 6017-6084.

Lee, J-Y., Nam, S-H., Im, S-Y., Park, Y-J., Lee, Y-M., Seol, Y-J., Chung, C-P., Lee, S-J. (2002). Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Journal of Controlled Release*, 78: 187-197.

Leggett, R.W. (2010). A physiological system model for iodine for use in radiation protection. *Radiation Research*, 174 (4): 496-516.

Lieder, R., Darai, M., Thor, M.B., Ng, C.H., Einarsson, J.M., Gudmundsson, S., Helgason, B., Gaware, V.S., Maasson, M., Gislason, J., Orlygsson, G., Sigurjoonsson, O.E. (2012). *In vitro* bioactivity of different degree of deacetylation chitosan, a potential coating material for titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100 (12):3392-9.

Lo, K.W-H., Ulery, B.D., Ashe, K.M., Laurencin, C.T. (2012). Studies of bone morphogenetic protein based surgical repair. *Advanced Drug delivery review*, 64 (12): 1277-1291.

López-Lacomba, J.L., García-Cantalejo, J.M., Sanz-Casado, J.V., Abarrategi, A., Correas, V., Ramos, V. (2006). Use of rhBMP-2 activated chitosan films to improve osseointegration. *Biomacromolecules*, 7: 792-798.

Muzzarelli RAA. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76: 167-82.

Morcillo-Alonso, M.A., Martín-Martín, F.R., Navarro-Bravo, T. (2000). Use of radioisotopes in biokinetic models with experimental animals. *Revista de salud ambiental*, 2 (1): 16-21.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 7(31): 603-632.

ABREVIATURAS

(θ)	Ángulo de contacto
\overline{M}_w	Peso molecular promedio en peso
\overline{M}_v	Peso molecular promedio viscoso
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
$t_{1/2}$	Semivida
μ -CT	Micro tomografía computarizada (del inglés <i>micro computerized tomography</i>)
^1H -RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de Protones.
AB	Alamarblue™
Abs	Absorbancia
AcH	Ácido acético
AcH/AcONa	Tampón de ácido acético acetato de sodio
ALP	Fosfatasa alcalina (del inglés <i>Alkaline Phosphatase</i>)
ASC	Células madre adultas (del inglés <i>Adult Stem Cell</i>)
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	Reflectancia total atenuada (del inglés <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas (del inglés <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>)
BMU	Unidad multicelular ósea (del inglés <i>Bone Multicellular Unit</i>)
BR	Bradford
BSU	Unidad estructural ósea (del inglés <i>Bone Structural Unit</i>)
CAI	Centro de ayuda a la investigación
DD	Grado de desacetilación (del inglés <i>Deacetylation Degree</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DRX	Difractograma de rayos X
ECM	Matriz extracelular (del inglés <i>Extracellular Matrix</i>)
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés <i>European Food Safety Authority</i>)
ESC	Células madre embrionarias (del inglés <i>Embryonic Stem Cell</i>)
FA	Adhesión Focal (del inglés <i>Focal Adhesión</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico (del inglés <i>Fibroblast Growth Factor</i>)

FT-IR	Espectroscopía de infrarrojos de transformada de Fourier (del inglés <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>).
GF	Factor de crecimiento (del inglés <i>Growth Factor</i>).
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GPC	Cromatografía de permeación de gel (del inglés <i>Gel permeation chromatography</i>)
GRAS	<i>Generally Recognised As Safe</i>
HE	Hematoxilina eosina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HU	Unidades Hounsfield
IC	Índice de cristalinidad
ICRP	Comisión Internacional de Protección Radiológica (del inglés <i>International Commission on Radiological Protection</i>)
IGF	Factor de crecimiento tipo insulínico (del inglés <i>Insulin like Growth Factor</i>)
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Índice de polidispersidad
KFDA	<i>Korean Food and Drug Administration</i>
MARG	Macroautorradiografía de cuerpo entero
MHKS	Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada
MI	Microscopía interferométrica (del inglés <i>Interferometric Microscopy</i>)
MSC	Células madre mesenquimales (del inglés <i>Mesenchymal Stem Cell</i>)
MTS	Sal de tetrazolio (del inglés 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphenyl) 2H-tetrazolium)
Mw	Peso molecular
NNP1	Nucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate buffered saline</i>)
PC	Plástico control tratado para cultivo celular
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés <i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
PET	Tomografía por emisión de positrones (del inglés <i>Positron Emission Tomography</i>)
PFA	Paraformaldehído
Pi	Fosfato inorgánico (del inglés <i>Phosphate</i>)
PPi	Pirofosfato (del inglés <i>Pyrophosphate</i>)

POM-C	Polioximetileno-C (del inglés <i>Polyoxymethylene-C</i>) Q: Quitosano
Q	Quitosano
rhBMP-2	Proteína morfogenética ósea recombinante humana de tipo 2 (del inglés <i>Recombinant Human Bone Morphogenic Protein-2</i>)
RT	Temperatura ambiente (del inglés <i>Room temperature</i>)
Sa	Rugosidad
SC	Células madre (del inglés <i>Stem Cell</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (del inglés <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SPET	Tomografía Computarizada de Emisión de un Fotón (del inglés <i>Single Positron Emission Tomography</i>)
TCM	Tricrómico de Masson
TE	Ingeniería de tejidos (del inglés <i>Tissue Engineering</i>)
TEMP	Productos médicos para ingeniería tisular (del inglés <i>Tissue Engineering Medical Products</i>)
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>Transformig Growth Factor Beta</i>)
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (del inglés <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>)
VOI	Volumen de Interés (del inglés <i>Volume of Interest</i>)
β -TCP	Fosfato tricálcico beta (del inglés <i>Tricalcium Phosphate Beta</i>)

I INTRODUCCIÓN

1. INGENIERÍA DE TEJIDOS

1.1. INTRODUCCIÓN

La Ingeniería de Tejidos (TE del inglés *Tissue Engineering*) constituye un área de investigación intrínsecamente multidisciplinar en la que se puede englobar, en cierta forma, la Medicina Regenerativa y la Terapia Celular. El principal objetivo de la TE es obtener sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función biológica dañada de un tejido u órgano. Requiere, para el desarrollo de éstos sustitutos terapéuticos válidos, la confluencia de científicos de muy diversas especialidades, tanto básicas como aplicadas, puesto que las construcciones a diseñar han de incluir al menos tres tipos de elementos de naturaleza muy diferente (Langer y Vacanti, 1993; Lanza *et al.*; 2000; Caplan, 2000; Atala, 2004).

Las células, uno de los elementos constituyentes de la TE han de proliferar y/o diferenciarse hacia el fenotipo específico del tejido a reparar. Este campo fundamentalmente biológico abarca desde la modificación genética de las células a implantar (terapia génica), hasta el desarrollo y caracterización de mecanismos de diferenciación de células progenitoras (SC, del inglés *Stem Cells*) hacia tipos celulares difíciles de expandir *in vitro*, con los métodos disponibles actualmente, a partir de cultivos primarios del propio paciente.

Por otra parte, estas células que forman parte de una construcción de TE, cuando se implantan en su localización anatómica definitiva se encuentran en un entorno biológico complejo. Muchas veces la lesión se ha producido por ausencia de las señales biológicas adecuadas que impulsan la reparación *per se* del tejido, bien por la falta de los agentes bioactivos necesarios en las cantidades adecuadas, o bien porque la lesión existente excede los límites que son capaces de reparar mediante mecanismos naturales del ser vivo (Maxson *et al.*, 2012).

Para afrontar este problema, se requiere tanto un aporte científico por parte de la biología del desarrollo (mediante la elucidación del mecanismo del desarrollo de los diferentes órganos en el tejido embrionario) como de la biología molecular, que permita no sólo la identificación de los genes implicados, sino también la expresión, purificación y producción de las proteínas recombinantes que éstos codifican. Estos factores, segundo componente de la TE, ejercen un papel regulador y muchas veces determinante en esos procesos, siendo necesarios en cantidades suficientes para la experimentación *in vivo* de su aplicación clínica. Se requiere tanto de conocimientos de la química y purificación de proteínas como de la biofísica y la biología evolutiva, origen ambas del desarrollo de los análisis mutacionales para la producción de proteínas recombinantes con mayor estabilidad o actividad para su aplicación

clínica (Salgado *et al.*, 2004).

Finalmente el tercer elemento constitutivo de cualquier construcción diseñada para la regeneración de tejidos son los biomateriales. Esta mención final no es por su menor importancia, al contrario, sino porque constituye el elemento imprescindible para que se pueda hacer realidad cualquier aproximación de la TE a la resolución de un problema clínico.

Las células que se cultivan han de crecer sobre un soporte bi o tridimensional. Dicho soporte ha de ser de tal naturaleza que permita dirigir el crecimiento celular (e incluso la diferenciación) de alguna manera. Los productos bioactivos que regulan el comportamiento celular han de ser liberados en localizaciones estrictas, han de estar de alguna forma confinados espacialmente de tal modo que ejerzan su acción en el sitio deseado y no en otro. Todas estas misiones subyacen en el diseño de un biomaterial adecuado.

A continuación se expone con algo más de detalle algunos aspectos relevantes de los diversos elementos constitutivos de una construcción de TE.

1.2. COMPONENTES BÁSICOS EN LA TE

1.2.1. Células

Como se ha indicado previamente, las células constituyen uno de los elementos esenciales en cualquier aproximación terapéutica de medicina regenerativa. La necesidad de su empleo en estas aproximaciones ha puesto de manifiesto toda una serie de problemas técnicos importantes relacionados con su uso, que ha sido preciso abordar y que han dado lugar a campos de investigación independientes y, sin embargo, muy relacionados con la TE (Forriol y Esparza, 2008).

El primero de ellos es: ¿De dónde provienen las células que han de proliferar y/o diferenciarse sobre el biomaterial integrante de la construcción a emplear en la regeneración tisular? Realmente sólo existen dos opciones:

- ❖ Que provengan del propio tejido del organismo huésped: ésta opción realmente está limitada a aquellos tejidos que poseen *per se* cierta capacidad de auto-regeneración. Esto sólo ocurre en un número muy limitado de tejidos, entre los que destacaremos, dada su importancia en el desarrollo de este trabajo, el tejido óseo.
- ❖ Que provengan de cultivos *in vitro*, bien de células especializadas, bien (y cada vez con mayor frecuencia, dada la imposibilidad de expandir gran número de tipos celulares hasta los niveles necesarios en estas aplicaciones) de células madre indiferenciadas.

Las células madre presentan una proliferación prácticamente ilimitada en las células

madre embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cell*) o muy elevada en las células madre adultas (ASC, del inglés *Adult Stem Cell*). Las ESC son capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular en el organismo adulto mientras que las ASC pueden diferenciarse solo a un número limitado de ellos. Esto ha dado lugar a una explosión de diversas investigaciones sobre los factores que regulan tanto el proceso de especialización de las células hacia un determinado tejido y función, como el proceso de desdiferenciación de las mismas, regresando al estado indiferenciado para reconvertirla en el tipo celular deseado (Tuan *et al.*, 2003; Bielby *et al.*, 2007; Kallai *et al.*, 2010; Maxson *et al.*, 2012).

Por otra parte, estas investigaciones han permitido no sólo un aumento del conocimiento sobre los diferentes mecanismos de regulación génica, que producen la diferenciación celular, sino también de aquellas sustancias (péptidos, proteínas, etc) cuya presencia, a los tiempos y concentraciones adecuados, controlan y dirigen el destino final de la célula (Duplomb *et al.*, 2007). Estos factores son clave en la señalización que lleve a la expresión de unos u otros genes y por lo tanto son fundamentales en los procesos de regeneración tisular. La identificación de estas sustancias ha llevado a su incorporación a los soportes empleados en TE (Biomateriales de tercera generación, como se clasificarán posteriormente).

En cualquier caso, independientemente de lo anteriormente expuesto, existen una serie de problemas comunes que nos vamos a encontrar sea cual sea el origen de las células que colonicen la construcción de TE. ¿Cómo afecta el biomaterial utilizado al proceso de proliferación celular? ¿Se afecta el metabolismo celular? ¿Se favorece o se impide de alguna manera los procesos de adhesión celular, previos al comienzo de la proliferación?

La respuesta a éstas preguntas ha dado lugar en los últimos años a un gran número de trabajos experimentales y que, parcialmente, se abordan en este trabajo con relación a nuestro biomaterial de elección.

1.2.2. Factores Bioactivos

Las células actúan y responden a los diferentes factores de su entorno (mecánicos, estructurales o químicos). En este sentido, los Factores de Crecimiento (GF, del inglés *Growth Factor*) desempeñan un papel fundamental en la regulación de acciones celulares tales como la migración, la proliferación o la morfogénesis. El conocimiento de la función de los factores de crecimiento en los procesos de remodelado y reparación ósea, ha llevado a intentar incorporar estas moléculas mediante técnicas variadas en el diseño inicial del biomaterial empleado en TE.

Los GF son expresados y secretados por las células al medio y la presencia de éstos en dicho medio provoca las modificaciones celulares pertinentes. La comunicación celular puede tener lugar de forma autocrina actuando en las mismas células que liberan los factores (mismo fenotipo celular) de forma paracrina, actuando sobre células vecinas (fenotipos diferentes) e incluso de forma endocrina, afectando a células de diferente fenotipo pertenecientes a otro tejido (Lieberman *et al.*, 2002).

La matriz ósea extracelular constituye una importante reserva de GF, especialmente los sintetizados por las células óseas como son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*) y los factores de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés *Transforming Growth Factor β*). Existen otros factores que participan en la osteogénesis y en la formación de matriz ósea, reclutando e induciendo la diferenciación de células osteoprogenitoras hacia linajes específicos como son, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés *Fibroblast Growth Factor*), los factores de crecimiento insulínico (IGF, del inglés *Insulin like Growth Factor*), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *Platelet Derived Growth Factor*) (Bose *et al.*, 2012; King y Krebsbach, 2012).

De entre todos los factores que intervienen en este proceso de regeneración ósea, las proteínas morfogenéticas óseas son sin duda las proteínas que más interés han despertado, puesto que inducen la diferenciación celular hacia fenotipos osteoblásticos, expresando marcadores como la Fosfatasa Alcalina (ALP, del inglés *Alcaline Phosphatase*) o la Osteocalcina, aparte de su efecto quimioatrayente de monocitos, neutrófilos, macrófagos y fibroblastos.

Las BMPs se consideran factores clave en la regulación de procesos como el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celular, jugando un papel importante en el desarrollo embrionario y de varios órganos y tejidos. Son las proteínas encargadas de formar el tejido óseo durante la embriogénesis e incluso actúan en la vida adulta en los procesos de reparación de fracturas (Sykaras y Opperman, 2003). Forman parte de la superfamilia de las TGF- β , junto con otras proteínas como las activinas/inhibinas, o los factores de crecimiento y diferenciación (DDF, del inglés *Differentiation Growth Factors*). Las BMPs han demostrado ser los GF más efectivos en la curación de fracturas, fusión espinal y no uniones (Mehta *et al.*, 2012; Lo *et al.*, 2012).

Actualmente se han identificado al menos 20 BMPs, que se encuentran divididas en diferentes subfamilias atendiendo a las similitudes en la secuencia de aminoácidos. La mayoría de ellas son citoquinas multifuncionales, a excepción de la BMP-1 la cual es una metaloproteasa y no pertenece a esta superfamilia TGF- β , destacando la BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 y BMP-9, como las proteínas que han demostrado presentar mayor actividad

osteoinductora y capacidad de formación de hueso ectópico (Kempen *et al.*, 2008; Bragdon *et al.*, 2011).

Gracias a técnicas de ingeniería genética se ha conseguido obtener la forma recombinante humana de la proteína BMP-2 (rhBMP-2 del inglés *Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2*). Esta proteína se sintetiza como precursor inmaduro, que consta de un péptido señal que dirige la secreción en el extremo N-terminal, un prodominio que estabiliza el plegamiento y un péptido maduro en el extremo C-terminal. La eliminación del dominio presente en la preproteína por acción de serin endoproteasas tras la dimerización, conlleva a la secreción de la proteína madura activa (Sieber *et al.*, 2009). La BMP-2 activa puede ser homodimérica (BMP-2/BMP-2) o heterodimérica (BMP-2/7, BMP-2/6) presentando ésta última, mayor actividad (Wozney *et al.*, 1988; Bragdon *et al.*, 2011; King y Krebsbach, 2012).

La solubilidad de la proteína se encuentra en función de la fuerza iónica y del pH de la solución. La proteína alcanza el máximo de solubilidad a baja fuerza iónica y pH ácidos (3-3,5). A partir de un valor de pH 5,5 la solubilidad decrece drásticamente siendo mínima a pH 6,5-7,5. De ahí en adelante la solubilidad aumenta hasta alcanzar un nuevo máximo de solubilidad relativo a pH 8-8,5 (pasado su punto isoeléctrico de 7,9), donde la proteína se encuentra desnaturalizada (González-Muñoz, 2004).

La estructura de la proteína fue descrita por Scheufler y colaboradores mediante estudios cristalográficos, revelando dos láminas β antiparalelas separadas, una α hélice y por último un nudo de cistina (Scheufler *et al.*, 1999). En dicho nudo se localizan los 7 residuos de cisteínas, característicos de la superfamilia TGF- β . Las cisteínas se unen para formar 3 puentes disulfuro intracatenarios (presentes en el extremo carboxi terminal) y la unión de los dos monómeros (de 114 aminoácidos) se establece entre las cisteínas 78 de cada unidad. La proteína presenta dos cavidades en la estructura cristalina, que se corresponden a los centros hidrofóbicos (Figura 1).

En la cavidad I, presente en el lado convexo, predominan las cargas positivas debido a la presencia de residuos con cadena básica, descrito a su vez como el sitio de unión a heparina. La cavidad II, localizada en el lado cóncavo, presenta predominio de cargas negativas debido a las cadenas ácidas de Glu-83 y Aps-105 y el extremo carboxilo, siendo la posible zona de unión al receptor tipo de serina-treonina-quinasa (Bragdon *et al.*, 2011).

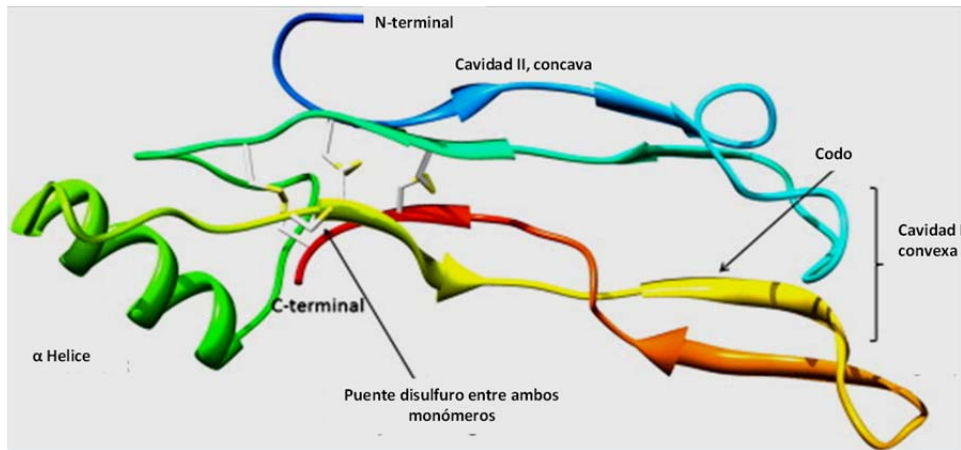


Figura 1. Representación de la estructura secundaria de la proteína, BMP-2. En ella se aprecian los extremos N y C terminal, la α hélice, los tres puentes disulfuro intracatenarios y las cavidades convexa (I) y cóncava (II).

Las BMPs desarrollan su actividad biológica mediante su unión a receptores heterodiméricos en la superficie celular (BMPRs), los cuales presentan un dominio extracelular rico en residuos de cisteínas, un dominio transmembrana y uno intracelular tipo serin-treonin-quinasas (Figura 2). Estos receptores son comunes a la superfamilia TGF- β conociéndose dos tipos de receptores, que en unión con la proteína BMP-2, dan lugar a un complejo estable. La interacción inicial tendrá lugar con el receptor que presente mayor afinidad. En general para la mayoría de las BMPs, el receptor con mayor afinidad es el de tipo I (BMPR-I) en cambio para otros miembros de la TGF- β es el de tipo II (BMPR-II) (Sieber *et al.*, 2009; Bragdon *et al.*, 2011).

El reconocimiento y unión del ligando con el receptor desencadena un cambio conformacional que conduce a la fosforilación del BMPR-I por parte del receptor BMPR-II (constitutivamente activo). La activación del BMPR-I desencadena la cascada de señalización, pudiéndose activar tanto la vías smad dependiente como independiente (Chen *et al.*, 2004).

La principal ruta de señalización celular (Smad dependiente) cursa con la fosforilación de las proteínas Smad (Figura 2) (Sieber *et al.*, 2009). Existen diferentes tipos de proteínas Smad las cuales se dividen en reguladas por receptores de membrana (R-Smad, como por ejemplo Smad-1, Smad-5 y Smad-8), las mediadoras (CO-Smad, como es la Smad-4) y las inhibitoras (I-Smad, como la Smad-6 y la Smad-7). Una vez fosforiladas las R-Smad, éstas dimerizan en el citoplasma con una Co-Smad, dando lugar a un complejo que se transloca al núcleo, actuando como factor transcripcional e iniciando la expresión de genes de respuesta temprana a la BMP-2 (Schmierer y Hill, 2007).

Se han descrito rutas alternativas de señalización intracelular, vías Smad independiente, como las MAPK, ERK o JNK en respuesta a la BMP-2 que pueden afectar la

proliferación celular (favoreciendo los procesos de diferenciación celular) existiendo todavía un conocimiento limitado al respecto (Sieber *et al.*, 2009).

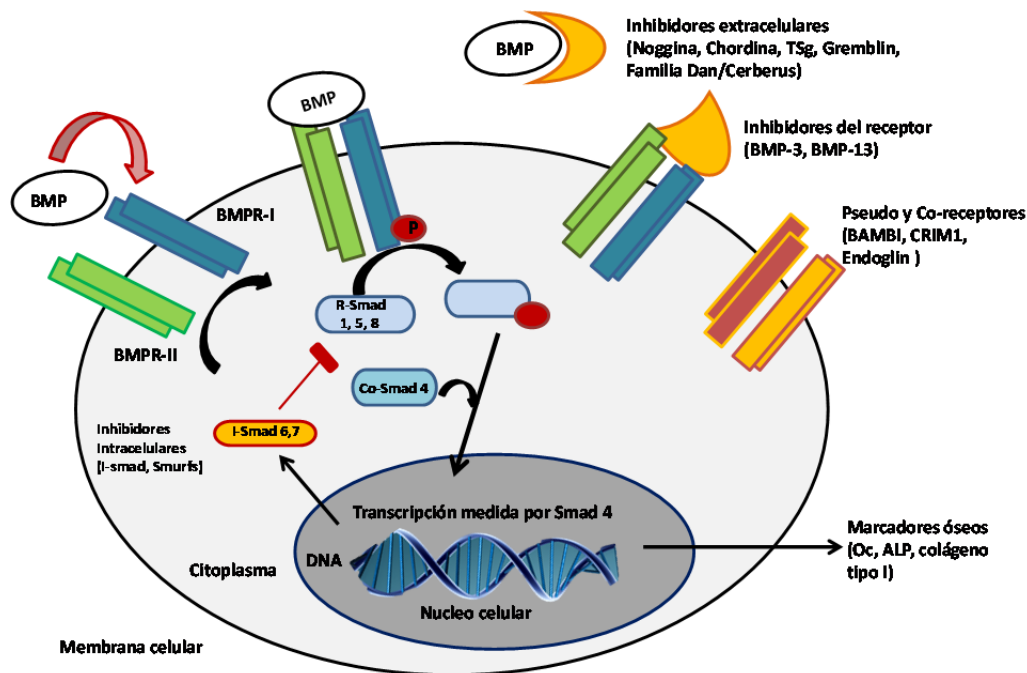


Figura 2. Esquema de la ruta de señalización celular de la BMP-2 vía Smad. A través del reconocimiento con los receptores de la membrana celular se desencadena una cascada de señales protagonizada por las proteínas Smad, que traducen la señal al interior del núcleo celular, iniciándose la respuesta a la acción de la proteína BMP-2. En ella se muestra también los diferentes tipos de antagonistas que regulan la expresión del factor.

La BMP-2, presenta una gran capacidad de estimular la regeneración ósea y de formar hueso ectópico en vertebrados adultos por lo que se considera de gran interés en el campo de TE (Cao y Cheng, 2005). En el 2004, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el uso biomédico como productos sanitarios de la rhBMP-2 y la rhBMP-7 para determinadas situaciones clínicas, como grandes defectos óseos, no uniones y fusión espinal anterior, lumbar y cervical. Existen diferentes productos disponibles en el mercado como InfuseTM (rhBMP-2, Medtronic, Minneapolis, MN, USA), Inducto^R (rhBMP-2, Wyeth Europa Ltd, London, UK), Osigraph^R (rhBMP-7, Wyeth Europa Ltd, Londres, UK) y OP-1 Putty, (rhBMP-7, Stryker Biotech, MA, USA) que emplean como transportador esponjas de colágeno (Lissenberg-Thunnissen *et al.*, 2011; Lo *et al.*, 2012).

Las BMPs actúan como agentes locales, necesitando permanecer en el defecto óseo durante un tiempo determinado para producir la diferenciación celular y la consiguiente regeneración tisular. Por ello son proteínas que requieren de una matriz portadora que permita su liberación de forma prolongada en el sitio de acción y proteja al factor de procesos

de degradación. Dicho transportador será indispensable para la administración de los mismos consiguiendo disminuir la dosis a administrar y los efectos secundarios que conlleva (Epstein *et al.*, 2011).

1.2.3. Biomateriales

Un biomaterial se define como una sustancia farmacológicamente inerte, de origen natural o sintético, diseñada para ser implantada o incorporada dentro del sistema vivo para tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo.

El tipo de biomateriales empleados con fines regenerativos en el campo de la biomedicina ha experimentado una evolución notable a medida que ha aumentado nuestro conocimiento sobre las interacciones de los mismos con el cuerpo humano. Así, en una primera etapa surgen los materiales de primera generación o “inertes”. El material se empleaba exclusivamente como método para restaurar las funciones perdidas, es decir, buscaban reemplazar el tejido minimizando efectos nocivos en el hospedador como por ejemplo los implantes de titanio (Liu *et al.*, 2004; Bose *et al.*, 2012).

Posteriormente se produjo un cambio en el concepto de la función de un biomaterial en el proceso de la regeneración tisular, pasando de considerarlo sólo un mero soporte mecánico, a diseñar sistemas en los que el material presenta *per se* cierta actividad biológica. Con mejores resultados, éstos materiales bioactivos o de segunda generación, interactúan en el organismo permitiendo su reemplazo por tejido del propio hospedador como por ejemplo las cerámicas de fosfato tricálcico (β -TCP del inglés *Tricalcium phosphate Beta*) o los biovidrios y evitando así una segunda intervención de retirada del implante (Hench y Polak, 2000; Nair y Laurencin, 2007).

Finalmente se han desarrollado los materiales de tercera generación, cuyo principal objetivo es estimular de forma específica la respuesta celular a nivel molecular mediante el empleo de sustancias activas. Son materiales que se adaptan al medio fisiológico, permitiendo la proliferación celular y el desarrollo del nuevo tejido, e incluso producen la activación de genes que estimulan la regeneración del mismo, por ejemplo cerámicas de β -TCP activadas con rhBMP-2 (Abarrategi *et al.*, 2008a).

Los diferentes biomateriales se pueden clasificar en función de su composición (materiales metálicos, cerámicos, poliméricos o compuestos) de su origen (naturales o sintéticos) e incluso en biodegradables o no biodegradables (Malafaya *et al.*, 2007, Schliephake, 2010).

Los materiales metálicos de titanio, cobalto, aluminio y sus aleaciones

correspondientes, son compatibles con los tejidos biológicos aportando buenas propiedades mecánicas (resistencia al desgaste por ejemplo) siendo empleados desde sus inicios en la reparación de tejidos duros de sostén. Sin embargo presentan ciertos inconvenientes, como procesos importantes de corrosión, que pueden derivar en el fracaso del biomaterial (Bose *et al.*, 2012).

Estos inconvenientes se solventan en parte con los materiales cerámicos (alúmina, porcelanas, hidroxiapatita, etc), con una baja reactividad química que les confiere un carácter inerte y que conlleva una adecuada biocompatibilidad. Este tipo de materiales promueven la proliferación celular (muchas veces de forma específica), permitiendo la síntesis por parte de éstas células de los componentes de la matriz extracelular (ECM del inglés *Extracellular Matrix*). Sus puntos débiles residen en una baja resistencia mecánica y nula elasticidad, limitando su uso en el campo de la regeneración ósea (Bose *et al.*, 2012).

Los materiales poliméricos son, con mucho, el grupo más variado y versátil dentro de los biomateriales, pudiendo clasificarse en función de su origen en: naturales (alginatos, dextranos, agarosa, celulosa, almidón, colágenos, quitosanos, etc) o sintéticos (poliestireno, poli- α -hidroácidos, poliésteres, polilactonas, etc).

Estos últimos ofrecen la posibilidad de ser manipulados de múltiples maneras, con unas características físico-químicas bien determinadas. Por todo ello, son los componentes más utilizados en la fabricación de dispositivos biomédicos abarcando sus aplicaciones desde un nivel extracorpóreo (catéteres, membranas de diálisis, lentes de contacto, vendajes para la curación de heridas, etc) hasta implantes permanentes (biosensores, válvulas cardiovasculares, etc) o temporales (suturas degradables, chinchetas de poli-L-láctico, sistemas de liberación de fármacos, etc) (Nair y Laurencin, 2007).

Como vemos, los biomateriales pueden ser biodegradables o no, naturales o sintéticos, pero siempre deben ser biocompatibles y no tóxicos, de tal forma que permitan y favorezcan el desarrollo de tejido *de novo*. Si son biodegradables, ha de poderse controlar la velocidad de degradación de forma que se ajuste asimismo a la velocidad de reparación, de sustitución del biomaterial por el propio tejido y sus productos de degradación han de ser inocuos.

En la actualidad es cada vez más frecuente el uso de polímeros biodegradables a expensas de los biomateriales tradicionales permanentes en aplicaciones de TE. Idealmente, al degradarse los primeros en el medio biológico y eliminarse sus productos de degradación mediante la actividad celular, se evita la necesidad de una segunda cirugía para retirarlos una vez cumplida su función regeneradora (Nair y Laurencin, 2007).

En este sentido, cobran fuerza los polímeros naturales derivados de la ECM tipo colágeno, condroitín sulfato, o los glucosaminoglucanos (GAGs del inglés *Glycosaminoglycans*)

ya que son sustancias presentes de forma natural en los organismos (Dhanikula y Panchangnula, 2004). Estos últimos presentan la ventaja adicional de ser capaces de unir *per se* a gran número de sustancias bioactivas presentes en el organismo, pudiendo actuar como sistemas reservorio controlando e interaccionando de forma específica con el medio biológico (Freier *et al.*, 2005).

Nuestro Grupo de Ingeniería de Tejidos lleva años desarrollando aplicaciones regenerativas basadas en quitosano. Sus propiedades de biocompatibilidad, no toxicidad, interacción con proteínas, bajo coste y su capacidad filmogénica, hacen de este polímero un material idóneo para el recubrimiento de superficies complejas en biomedicina (López-Lacomba *et al.*, 2006).

Los estudios desarrollados previamente en nuestro el laboratorio nos han permitido inmovilizar con éxito una proteína morfogenética ósea, concretamente la rhBMP-2 sobre filmes de quitosano, demostrando el mantenimiento de su actividad diferenciadora hacia líneas osteoblásticas de células ya pre-diferenciadas hacia otros fenotipos (Abarategi *et al.*, 2008b).

Las investigaciones permitieron desarrollar una tecnología para la obtención de forma reproducible de un material osteoinductor capaz de permitir la reparación de lesiones óseas y mejorar la oseointegración de implantes dentales de titanio en experimentos realizados *in vivo*, como se muestra en la Figura 3.

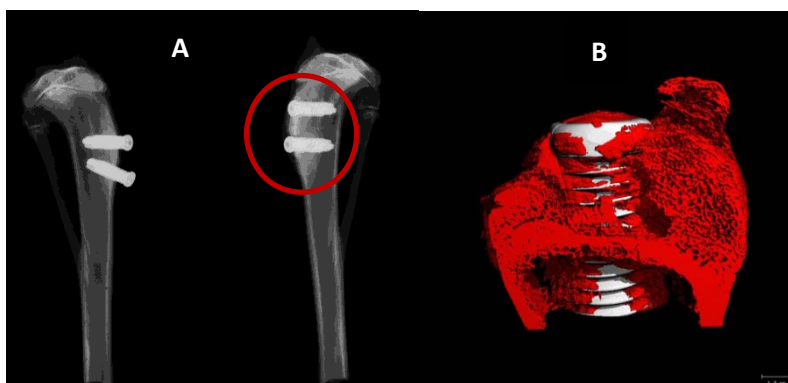


Figura 3. A) Radiografía de implantes dentales colocados en tibia de conejo, a su derecha los implantes activados con filmes de quitosano y rhBMP-2, a su izquierda, los implantes control. La tibia izquierda se corresponde con los implantes control (sin recubrimiento). B) Imagen de μ -CT del implante dental superior de la tibia derecha.

En ella se puede observar una notable mejora de la regeneración del defecto óseo en los implantes recubiertos con filmes de quitosano y proteína rhBMP-2. Son evidentes tanto la capacidad de creación vertical de hueso alrededor del implante (imagen de μ -CT), como la

densidad de tejido óseo *de novo* (radiografía aportada).

2. QUITOSANO

2.1. INTRODUCCIÓN

La quitina (del griego *chitōn*, manto, túnica) se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza junto con la celulosa. Sus fuentes principales de obtención son el exoesqueleto de los invertebrados, sobre todo artrópodos (crustáceos e insectos), hongos (*Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*), algas y moluscos (Kurita *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2004; Muzzarelli y Muzzarelli, 2005; Harish-Prashanth y Tharanathan, 2007; Kasaai, 2010; Domard, 2011). La principal fuente industrial de este biomaterial procede del tratamiento de caparazones de crustáceos (producto de desecho de la industria pesquera) (Goycoolea *et al.*, 2000).

Se compone de unidades de 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucosa unidas mediante enlaces β (1-4). Su fórmula química es muy similar a la de la celulosa, diferenciándose de esta última por la presencia de un grupo acetamida, sustituyendo el grupo hidroxilo del C₂ de la celulosa (Figura 4) (Kumar *et al.*, 2004). Esta similitud se refleja en los roles parecidos que cumplen estos dos biopolímeros en la naturaleza, ambos actúan como materiales estructurales, de soporte y defensa del organismo frente a las condiciones ambientales que lo rodea (Abdou *et al.*, 2008). La quitina se encuentra también estructuralmente relacionada con la mureína, principal polímero estructural de la pared celular de las bacterias (Kumar *et al.*, 2004; Muzzarelli y Muzzarelli, 2005).

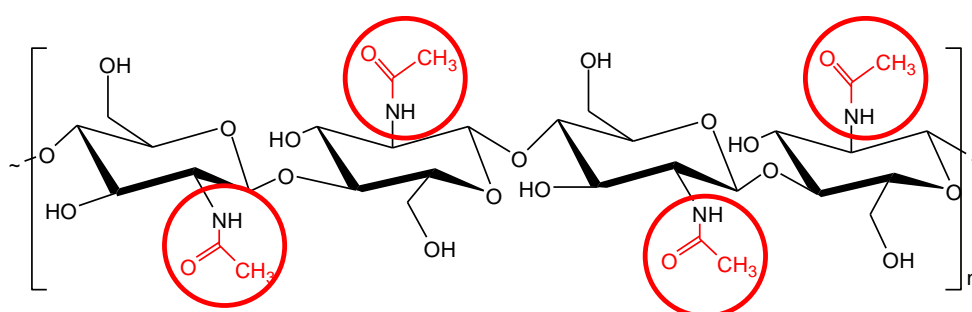


Figura 4. Estructura química de la quitina, destacando su grupo acetamido.

La quitina se presenta en una matriz compleja en unión con otras sustancias. En los exoesqueletos de crustáceos e insectos está unida con proteínas, mientras que en los hongos se encuentra unida con otros polisacáridos, inclusive con celulosa. La quitina se aísla en el laboratorio tras varios procesos de purificación necesarios para la eliminación de minerales

calcáreos, pigmentos y proteínas (Agulló *et al.*, 2004).

En la actualidad el método industrial se basa en procedimientos químicos para retirar las proteínas y el material insoluble. Generalmente la materia prima se lava con agua, detergentes y se muele hasta obtener pequeños fragmentos. Posteriormente se tratan con bases y ácidos fuertes para eliminar las proteínas y sales minerales respectivamente. Los pigmentos se eliminan en una etapa posterior mediante disolventes orgánicos (Figura 5). La quitina así obtenida se presenta en forma de polvo o escamas, de color blanco a rosado (Percot *et al.*, 2003; Naznin, 2005).

Existen métodos otros alternativos para la obtención de quitina, como la fermentación microbiana o extractos enzimáticos, siendo procesos sostenibles con el medio ambiente ya que no conllevan el empleo de ácidos y bases fuertes (Xu *et al.*, 2008; Manni *et al.*, 2010).



Figura 5. Esquema simplificado de la obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos.

De estructura similar a la celulosa, la quitina es insoluble en solventes típicos como agua, solventes orgánicos, ácidos y bases diluidas, siendo un polímero de difícil manipulación que se disuelve en ácidos minerales concentrados y a elevadas temperaturas con la consiguiente degradación del polímero. Se disuelve empleando hexafluoreacetona, hexafluoroisopropanol, cloroalcoholes asociados a ácidos minerales e incluso en N,N-dimetilacetamida conteniendo un 5% de cloruro de litio, siendo éste un solvente típico (Dutta *et al.*, 2004).

Esta estabilidad se debe a la disposición ecuatorial estable de los sustituyentes y a la unión $\beta(1\rightarrow4)$ de los anillos de piranosa. La configuración β de los enlaces glicosídicos permite estructuras de cadenas rectas con fuertes enlaces hidrógenos intercatenarios.

La desacetilación de la quitina, vía enzimática o alcalina, conduce al polímero quitosano que se define como “un polisacárido lineal constituido por unidades de 2-

acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa, unidad de N-acetil glucosamina (GlcNAc del inglés *N-acetyl glucosamine*) y 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa, unidad de glucosamina (GlcN del inglés *Glucosamine*) unidas mediante enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4)” (Figura 6) (Kumar *et al.*, 2004).

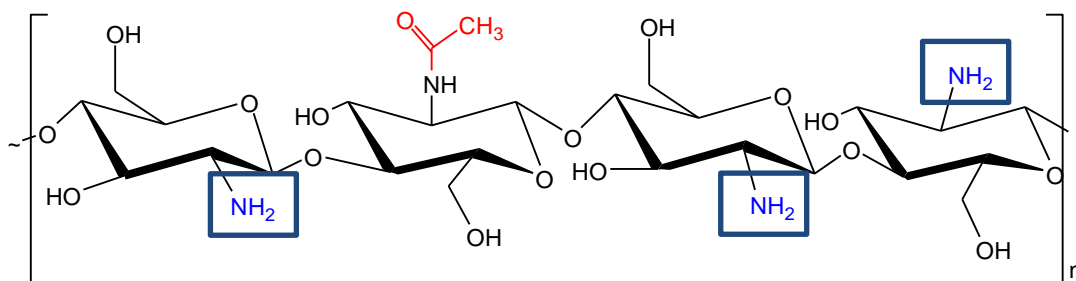


Figura 6. Estructura química del quitosano, enmarcando su grupo amino libre.

La obtención de quitosano mediante desacetilación del C₂ de la quitina puede realizarse mediante diferentes metodologías (Figura 7). La vía enzimática se basa en el empleo de la enzima quitina desacetilasa, identificada y purificada por primera vez a partir de extractos del hongo *Mucor rouxii*. Esta vía, no es muy efectiva ya que la enzima no actúa sobre quitina insoluble y, en consecuencia, requiere una quitina previamente tratada para favorecer el acceso de la enzima a dichos grupos acetilo (Aranaz *et al.*, 2009).

El método químico consiste en una desacetilación en fase homogénea o heterogénea en función de las condiciones del proceso. Una desacetilación heterogénea conlleva el empleo de un medio fuertemente alcalino (hidróxido de sodio o potasio al 40-50% p/v) elevadas temperaturas (60-130°C) y tiempos cortos (Aiba, 1991; 1992). Esta reacción no ocurre al azar, Kurita y colaboradores observaron que dicho proceso ocurre preferentemente en la región amorfa de la quitina (Kurita *et al.*, 1977). Como producto final se obtiene un quitosano con secuencias de GlcNAc en bloques de tres residuos. En la actualidad, este es el tratamiento industrial para la obtención de quitosano a gran escala (Kumar *et al.*, 2004).

En cambio, una desacetilación homogénea requiere condiciones más suaves, tanto de álcalis (concentraciones moderadas de un 13% p/v) como temperaturas bajas y tiempos prolongados e incluso de un pretratamiento de hinchamiento de la quitina alcalina (Sannan *et al.*, 1975). De esta manera el proceso de desacetilación de la quitina transcurre de forma aleatoria, produciendo quitosanos con una distribución de residuos de GlcNAc y GlcN al azar (Vårum *et al.*, 1997; Kurita, 1998; Goycoolea *et al.*, 2000). No obstante, la N desacetilación homogénea requiere tiempos prolongados y conlleva a una destrucción de la estructura secundaria, siendo las principales razones por las que no es frecuente emplear dicho método (Tsaih *et al.*, 2003).

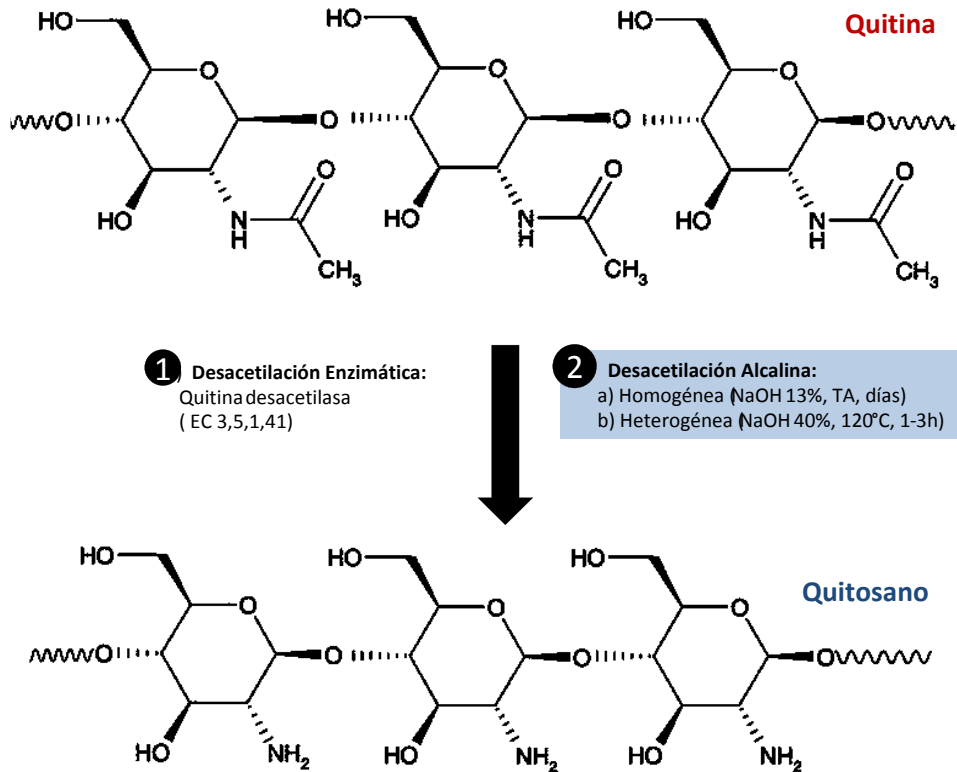


Figura 7. Métodos de obtención de quitosano mediante desacetilación de la quitina. Existen dos variantes de la desacetilación mediante álcali, cuyas principales diferencias se basan en las condiciones empleadas del proceso, fase heterogénea (condiciones más severas, método industrial) y fase homogénea (requiere condiciones más suaves y tiempos más largos). La desacetilación enzimática, menos frecuente, emplea la quitina desacetilasa (Fuente Dai *et al.*, 2011).

El quitosano es insoluble en agua, una de las razones de esa insolubilidad radica en la rígida estructura cristalina de estos polímeros, y sobre todo como afirman Kurita y colaboradores, en la formación de asociaciones puente hidrógeno intra e intermoleculares entre residuos de acetamida (Kurita *et al.*, 1991). No obstante, la desacetilación de la quitina produce un derivado más soluble que ella, ya que en medios ácidos diluidos, tanto orgánicos como inorgánicos, se protonan los grupos amino libres del quitosano, produciéndose un polication que permite la formación de soluciones. Cuando un contraión polivalente, por ejemplo, sulfato o fosfato están presentes, puede ocurrir la interacción iónica entre las cadenas del polímero cargadas, resultando en un aumento de la viscosidad de la solución, llegando incluso con altas concentraciones de contraiones a la precipitación del quitosano formando agregados (Roberts, 1992; Roberts, 1998).

2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

El quitosano es un polímero heterogéneo de unidades de GlcN y de GlcNAc, cuyas propiedades también se ven influenciadas por la estructura y composición del mismo. La fuente y el método de obtención determinan la composición y tamaño de las cadenas de quitosano (Galed *et al.*, 2005). La relación entre las unidades de GlcN / GlcNAc se define como Grado de desacetilación (DD) y se expresa en porcentaje. La quitina al disponer teóricamente de todos sus grupos amino acetilados, presentaría un DD del 0% mientras que si se alcanza la desacetilación completa tendríamos de quitosano (DD del 100%). En la práctica los polímeros con un DD superior al 50-60% se consideran quitosanos (Domard y Domard, 2002). Existen numerosos métodos que permiten valorar y determinar este parámetro fundamental, como son técnicas espectroscópicas (IR, UV, NMR), cromatografía de exclusión molecular (GPC), valoraciones titulométricas, etc (Brugnerotto *et al.*, 2001a). El DD es un valor fundamental que determina no sólo la solubilidad del quitosano, sino también sus propiedades biológicas (Roberts, 2008; Rinaudo, 2008). Este parámetro representa el número de grupos amino libres capaces de protonarse, pudiendo interactuar con moléculas o estructuras cargadas negativamente, como son las proteínas o las membranas celulares (Aranaz *et al.*, 2009).

La estructura primaria depende de la secuencia de los dos monómeros en la cadena: de GlcNAc (A) y GlcN. (D). La estructura secundaria se establece en solución con las interacciones inter e intramoleculares con las moléculas de agua o solvente. Ambas estructuras presentan diferentes patrones de difracción de rayos X, en función del estado en el que se encuentre el polímero (Figura 8). Así por ejemplo, el quitosano en estado sólido muestra una estructura similar a una doble hélice rígida muy diferente a la estructura cristalina del quitosano en solución, ya que ésta sufre una torsión debida a la presencia de aniones presentes en el solvente, mostrando una hélice relajada (Weinhold *et al.*, 2009).

Sakajiri y colaboradores estudiaron la estructura terciaria del polímero, observando que a 310k, la doble hélice extendida cambiaba a una estructura en forma de horquilla, la cual se mantiene estable incluso al congelar la muestra (Sakajiri *et al.*, 2006). La asociación de muchas cadenas poliméricas mediante interacciones intermoleculares conduce a la estructura cuaternaria.

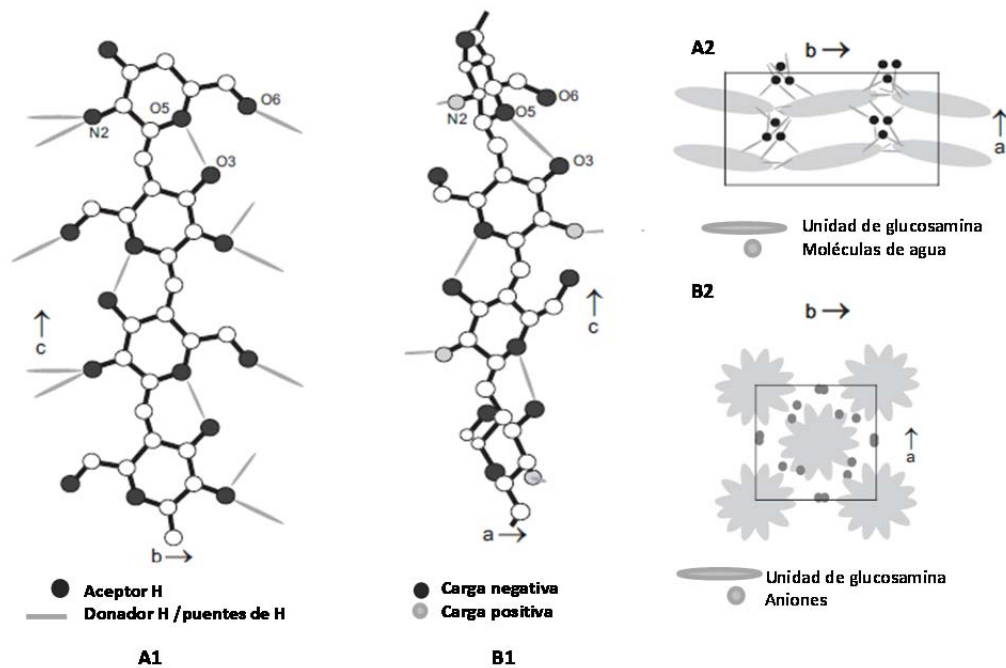


Figura 8. Modelo de las estructuras cristalinas de un oligómero de quitosano totalmente desacetilado (A1 y A2) y de hidrócloruro de quitosano (B1 y B2). A1 presenta una hélice extendida muy estable debido a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares (entre los oxígenos O3–O5, O3–O6,) e intermoleculares (N2–O6) similar a los enlaces presentes en la quitina. En B1 la estructura helicoidal cambia de extendida a relajada debido a las interacciones iónicas (por la presencia de aniones cloruro) que debilitan los enlaces intra e intermoleculares de hidrógeno produciendo un giro de la cadena en su eje c (Fuente Weinhold *et al.*, 2009).

Ogawa y colaboradores, estudiaron la estructura cristalina de diferentes muestras de quitina y quitosano preparadas mediante dos procesos fundamentales, la desacetilación parcial de la quitina y la parcial reacetilación del quitosano (Ogawa, 1991). Observaron que el material obtenido mediante reacetilación presentaba una estructura menos cristalina que el quitosano de procedencia. La solubilidad del quitosano aumenta al disminuir el Índice de Cristalinidad (IC) pero existen otros factores como el origen de la quitina, o tratamientos posteriores como reprecipitación, secado o liofilización, que van a influir en la estructura cristalina residual del quitosano (Ogawa *et al.*, 2004).

El peso molecular promedio es uno de los parámetros más característicos de este polímero y de enorme influencia en sus aplicaciones finales. El peso molecular promedio representa la media de los pesos de todas las moléculas presentes en la muestra. Las dos formas más comunes de expresar el peso molecular son: el peso molecular promedio en número \overline{M}_n y el peso molecular promedio en peso \overline{M}_w . Estos promedios se definen según las siguientes ecuaciones:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i NiMi}{\sum_i Ni} \quad \overline{M}_w = \frac{\sum_i WiMi}{\sum_i Wi} = \frac{\sum_i NiMi^2}{\sum_i NiMi}$$

donde Ni es el número de moléculas que tienen un peso molecular específico Mi y Wi es el peso de las moléculas que tienen un peso molecular específico Mi . La relación entre $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ se denomina Índice de Polidispersidad (IP), que suele presentar valores entre 1,5 y 3 para quitosanos comerciales. El peso molecular promedio en peso es el más empleado y, aunque es un parámetro difícil de obtener de forma precisa, se puede determinar por varios métodos, mediante cromatografía de exclusión molecular (GPC del inglés *Gel permeation chromatography*) o ultracentrifugación analítica (Wang *et al.*, 1991; Brugnerotto *et al.*, 2001b). Dependiendo de la técnica empleada se obtienen valores diferentes de peso molecular promedio que pueden variar en uno o más órdenes de magnitud.

Otro método para determinar el M_w es mediante viscosimetría obteniéndose en este caso el peso molecular promedio viscoso \overline{M}_v , que dependerá principalmente del tipo de solvente y de la temperatura empleada. La viscosidad intrínseca $[\eta]$ es una medida del volumen hidrodinámico que ocupan las macromoléculas en solución y por tanto un reflejo de su tamaño. La concentración del polímero influye notablemente en este parámetro (Kassai, 2007; Desbrieres, 2002). Además, el origen de la quitina y el método de obtención del quitosanos también van a influir en el M_w del polímero (Roberts y Domszy, 1982).

Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, se forma la amina primaria (NH_2) en los monómeros desacetilados. Esta amina se protona (NH_3^+) aumentando su solubilidad en medios ácidos diluidos y formando sales, siendo el pK_a del grupo amino en el quitosano de 6,5 (Tommeraas *et al.*, 2001). La solubilidad de este polímero no sólo se encuentra influenciada por el tamaño de las cadenas (M_w) o la densidad de grupos amino (DD) (Anthonsen *et al.*, 1993) sino también por otros factores como son el pH y la fuerza iónica de la solución, el tipo de solvente, la temperatura o la concentración de ácido empleado (Aranaz *et al.*, 2009).

Tanto el DD como el M_w son parámetros determinantes de las propiedades del quitosano, repercutiendo de forma específica en su biodegradabilidad y actividad biológica y por lo tanto son dos parámetros de obligado conocimiento en la caracterización de este polímero. Existen otras características químico-físicas como el contenido de agua, cenizas y metales pesados que también deben ser consideradas a la hora de emplear el polímero en una aplicación biomédica determinada (Rinaudo, 2006; Aranaz *et al.*, 2009; Kumirska *et al.*, 2011).

2.3. DEGRADACIÓN DEL QUITOSANO

La quitina y el quitosano son degradados por un amplio espectro de enzimas, destacando como enzimas específicas las quitinasas y las quitosanasas, con actividad quitosanólítica (Hsiao *et al.*, 2008; Kuroiwa *et al.*, 2008; Denhart *et al.*, 2008). La especificidad de estas enzimas permite hidrolizar quitosanos parcialmente acetilados produciendo principalmente heterooligosacáridos y quitosanos de bajo peso molecular con una mayor solubilidad (Xia *et al.*, 2011).

Alternativamente se ha estudiado el uso de otras enzimas no específicas que incluyen hemicelulasas, lipasas, pectinasas, proteasas, lisozimas y celulasas (Cabrera y Cutsem, 2005; Muzzarelli, 1997; Abd-Elmohdy *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2004).

2.3.1. Degradación enzimática vía quitosanasas

Las quitosanasas son enzimas hidrolíticas que reconocen las uniones glicosídicas del quitosano parcialmente desacetilado de forma endo-hidrolítica. En la naturaleza se encuentra en numerosos organismos desde bacterias hasta hongos (Izume *et al.*, 1992). Se clasifican en familias de glicosil hidrolasas en base a la similitud de su secuencia pero presentan una gran multiplicidad en la especificidad de sustrato que sí depende del microorganismo de procedencia (Chiang *et al.*, 2003). Por lo general, la principal fuente de obtención de esta enzima es de origen bacteriano, en concreto de la bacteria *Bacillus* y de *Streptomyces griseus*.

Dentro de la molécula de quitosano se distinguen 4 tipos de enlaces, GlcNAc-GlcNA (A-A), GlcNAc-GlcN (A-D), GlcN-GlcNAc (D-A) y GlcN-GlcN (D-D) y en función del tipo de enlace que degraden se agrupan en tres subclases. La subclase I hidrolizan enlaces tipo A-D y D-D, las de clase II solo enlaces D-D y las de clase III enlaces D-A y D-D. Como mínimo se necesita al menos un residuo GlcN en alguno de los monómeros para que dicha enzima sea activa, por lo tanto ninguna quitosanasas hidroliza enlaces del tipo A-A. La rotura de los enlaces tipo A-D y D-A da lugar a un residuo GlcNAc en el extremo reductor o no reductor de los productos, respectivamente (Figura 9). La quitosanasas puede alojar al menos seis residuos de GlcN en el dominio de unión a sustrato y la hidrólisis ocurre en el punto medio de este (Fukamizo *et al.*, 1995; Vårum *et al.*, 1996). Dichas enzimas requieren tres o más unidades de GlcN o GlcNAc para desarrollar su actividad. Tienen un peso molecular aproximado de 34×10^3 g/mol determinado por SDS-PAGE y un punto isoeléctrico de 9,7. Su pH óptimo es de 5,7 y la temperatura óptima de 60°C (Tanabe *et al.*, 2003). Existen dos aminoácidos esenciales en su

estructura para que tenga lugar la acción catalítica, Glu-22 y Asp-40, que actúan como donador y aceptor de protones.

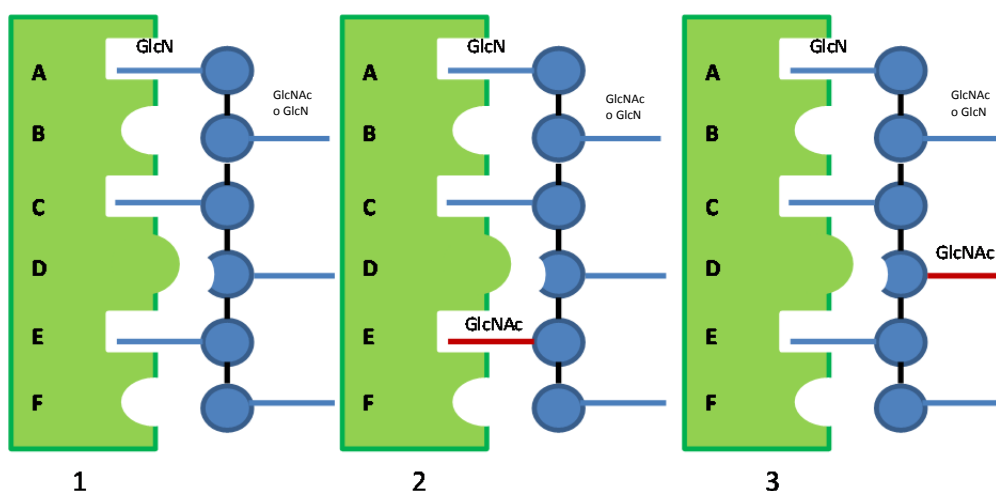


Figura 9. Representación esquemática del centro catalítico de la enzima quitosanasasa y los diferentes enlaces que reconoce. En la posición 1 se muestra la rotura del enlace glicosídico β (1-4) entre unidades D-D, en la posición 2 se representa la rotura del enlace D-A y en la tercera posición el enlace A-D.

2.3.2. Degradación enzimática vía lisozima

La degradación *in vivo* del quitosano se debe principalmente a la acción no específica de la enzima lisozima aunque también se encuentra sometido en menor proporción a la actividad de otras enzimas inespecíficas anteriormente mencionadas como lipasas, celulasas, pectinasas, proteasas y hemicelulasas. Aunque la degradación del quitosano depende del organismo en el que se encuentre, los subproductos de degradación, sacáridos y glucosaminas, son gradualmente absorbidos por el cuerpo humano, siendo productos biocompatibles, no tóxicos, no inmunogénicos y no carcinogénicos (Muzzarelli, 1997; Mengatto *et al.*, 2012).

La lisozima es una endo-carbohidrasa, también denominada muramidasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces β -(1 \rightarrow 4) glicosídicos de peptidoglicanos de la pared celular de ciertas bacterias, de la quitina y de quitosanos parcialmente desacetilados (Nordtveit *et al.*, 1996). En el cuerpo humano se encuentra en todos los fluidos corporales, como saliva, lagrime, orina, jugos gástricos e incluso en el interior de células fagocíticas, activadas por daño tisular, como son macrófagos y neutrófilos). La concentración correspondiente de la enzima en el suero humano depende de la edad y alcanzo valores desde 0,950 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ siendo frecuentemente empleada en ensayos *in vitro* concentraciones de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hankiewicz y Swierczek, 1974; Brouwer *et al.*, 1984; Porstmann *et al.*, 1989; Freier *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de esta enzima (Figura 10), se encuentra relacionado con la estructura química del polímero. En su centro activo se localizan seis cavidades, que reconocen seis residuos de glucopiranososa con 3-4 o más grupos acetilados para iniciar la degradación del polímero. Los sitios alternados A, C y E interaccionan con cadenas acetamida laterales de residuos GlcNAc y la hidrólisis tiene lugar en el enlace β (1-4) entre los subsitios D y E (futuros extremos reductor y no reductor, respectivamente). Sin embargo es una enzima incapaz de escindir el enlace glicosídico en secuencias de GlcN y en segmentos en los que existen pequeñas fracciones de residuos de GlcNAc distribuidos aleatoriamente en la cadena (Aiba, 1996; Varun *et al.*, 1996). Por lo tanto puede hidrolizar los enlaces AA-AA y AA-AD pero no los AD-AA ni tampoco los DD-AA. La lisozima tiene un peso molecular de 14,4 kDa con un pH óptimo cercano a 5, causado por los valores de pK_a tan distintos del Asp-52 y del Glu-35 (que actúan como aceptor y donador de protones, respectivamente) y que se encuentran en el sitio activo de la lisozima (Shigemasa *et al.*, 1994; Nordtveit *et al.*, 1994).

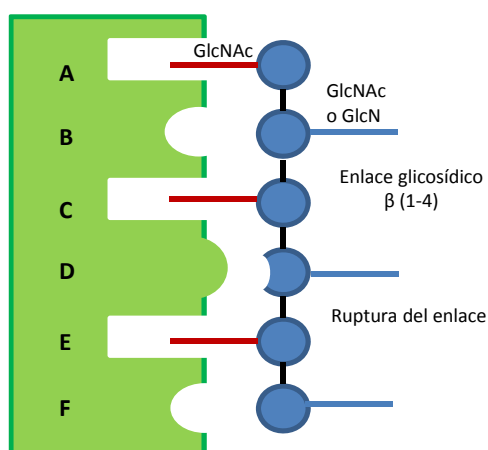


Figura 10. Mecanismo de acción de la enzima lisozima. En el sitio catalítico tiene lugar el reconocimiento del hexasacárido, adquiriendo una conformación tensa en el cuarto azúcar (D) y produciéndose la ruptura de dicho enlace.

Numerosos estudios indican que la acción de dicha enzima depende notablemente del grado de desacetilación estableciéndose una relación inversa entre ambos parámetros. Según este mecanismo la enzima lisozima no sería activa frente a quitosanos totalmente desacetilados y ni totalmente acetilados. Sin embargo, filmes de quitina han mostrado una mayor pérdida de masa frente a filmes de quitosano de elevado DD, empleando lisozima en tampón fosfato, pH 7,4 (Tomihata y Ikada, 1997).

La degradación de quitosanos con un DD intermedio-bajo (cerca del 60%) sufre una degradación más acusada en el tiempo, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bumgardner *et al.*, 2003). A medida que aumenta el valor de este parámetro (DD), el polímero muestra una mayor resistencia a la degradación, siendo este proceso mucho más lento y destacando un aumento del tiempo de residencia en el organismo (Figura 11). Este hecho se explica ya que quitosanos

con un DD elevado, presentan menor cantidad de unidades acetiladas consecutivas necesarias para la degradación por parte de la enzima (Hirano *et al.*, 1989). Además DD superiores al 95% muestran estructuras de elevada cristalinidad, dificultando aún más el ataque enzimático. Al contrario de lo esperado, quitosanos con bajo DD (inferiores al 50%), con gran cantidad de grupos acetilados en su estructura, tampoco muestran una velocidad de degradación superior debido a esa elevada cristalinidad, anteriormente comentada (Bumgardner *et al.*, 2007; Freier *et al.*, 2005).

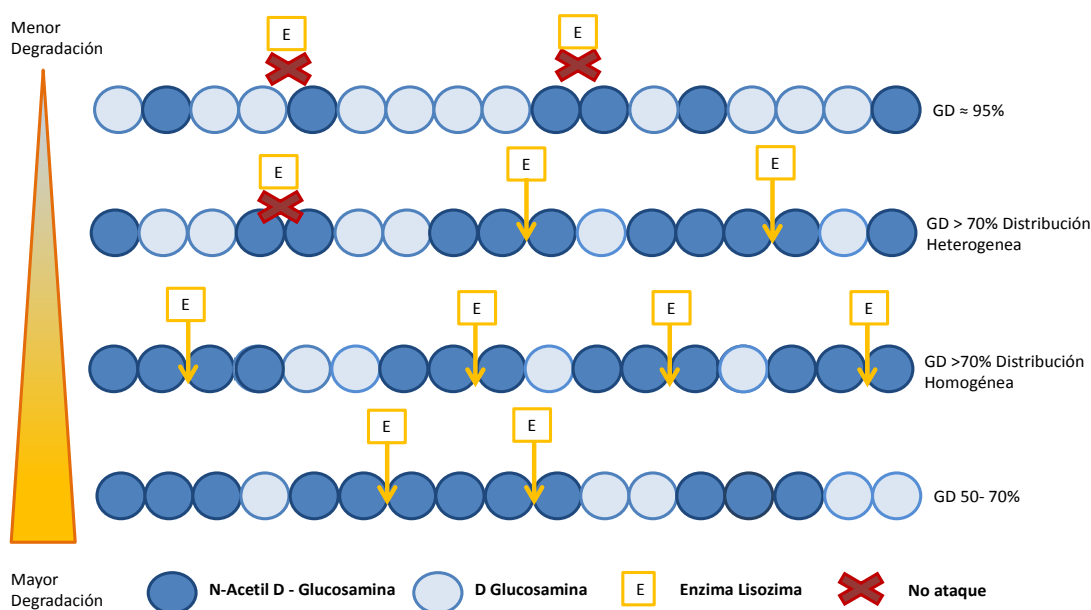


Figura 11. Imagen representativa de la influencia del DD y distribución de los grupos acetilo en la degradación del polímero *in vitro*. Quitosanos con elevado DD no son sensibles al ataque enzimático vía lisozima debido a la baja probabilidad de encontrar tres o más residuos de acetamida en la estructura. En cambio quitosanos con DD menor son fácilmente hidrolizables.

Además del DD existen otros factores muy influyentes en el proceso de degradación como son el origen de la quitina, la longitud de las cadenas (representado por el Mw) y el empaquetamiento cristalino. La distribución de los grupos acetilo en la cadena afecta a la biodegradabilidad, si se encuentran de forma heterogénea u homogénea presentando ésta última una mayor velocidad de degradación (Aiba, 1993).

Kofuji y colaboradores estudiaron la degradación vía lisozima sobre quitosanos de diferente Mw, determinando cambios en la viscosidad de las soluciones de los polímeros, y observaron que quitosanos de mayor Mw mostraron velocidades de degradación superiores (Kofuji *et al.*, 2005).

Los productos procedentes de la degradación del quitosano, tanto quitoligómeros como los residuos de GlcNAc y GlcN, favorecen la curación de heridas. No sólo promueven la activación de macrófagos, la formación de depósitos de colágeno y la vascularización del nuevo tejido, sino que también van a formar parte de la matriz extracelular formando parte de compuestos como dermatan sulfato, condroitin sulfato y ácido hialurónico (Muzzarelli, 1997).

La glucosamina por si sola presenta actividad antiinflamatoria, es sintetizada por el cuerpo humano desde la glucosa e incorporada en forma de glucosaminoglucanos y glicoproteínas (Muzzarelli, 2009; Muzarrelli *et al.*, 2012).

2.3.3. Degradación Química

En medios ácidos diluidos, el quitosano sufre una degradación debido al pH ácido de la disolución. Mediante hidrólisis química se produce gran cantidad de N-glucosamina libre y menor cantidad de heterooligosacáridos debido a la menor especificidad de la reacción. La lisis del polímero puede ser producida por diferentes reactivos químicos como el HCl, H₂O₂ o el HNO₂, sin embargo el proceso de depolimerización es difícil de controlar dando como resultado modificaciones en la estructura (Kumar, 2000).

2.4. BIOCMPATIBILIDAD Y TOXICIDAD

La biocompatibilidad de un material se define como la ausencia de efectos tóxicos o perjudiciales en los sistemas biológicos. Esto implica que el tejido del paciente que entra en contacto con dicho material no sufre ningún efecto tóxico irritante, inflamatorio o genotóxico. Existen normas de calidad ISO de obligado cumplimiento para testar la toxicidad y biocompatibilidad *in vitro* de un biomaterial. Una herramienta fundamental para evaluar la toxicidad y proporcionar el conocimiento de los mecanismos de inducción de toxicidad de un compuesto son los cultivos *in vitro* (Hirano *et al.*, 1990; Rodrigues *et al.*, 2012).

El quitosano ha demostrado ser un polímero inocuo y seguro. La biodegradación del quitosano produce oligosacáridos que posteriormente pueden ser eliminados o reabsorbidos fácilmente por el organismo. La dosis Letal 50 del quitosano (LD₅₀) se establece en 16 g/Kg en una administración oral, valor muy similar al del azúcar y siendo su toxicidad menor que la de la sal (Arai *et al.*, 1968; Hirano *et al.*, 1990).

Este polímero posee un perfil de toxicidad seguro estando aprobado como excipiente de productos farmacéuticos, desde el 2002 bajo la forma de hidrocloreuro de quitosano (Farmacopea Europea, 2002) y desde el 2011 como quitosano (Farmacopea Europea, 2011).

Tanto el DD como Mw del polímero son las principales características relacionadas con la viabilidad celular, existiendo numerosos estudios *in vitro* que corroboran una citocompatibilidad adecuada (Schipper *et al.*, 1996; Chatelet *et al.*, 2001; Lieder *et al.*, 2012). Sin embargo existe disparidad de resultados en función de las características del quitosano y de la línea celular empleada. Algunos autores describieron los efectos de quitosanos en función del Mw y del DD, mostrando cierta relación entre la densidad de cargas presentes en mismos y su toxicidad en fibroblastos y osteoblastos (Kean y Thanou, 2010).

En la experimentación *in vivo* se ha observado que tanto en implantes de titanio recubiertos de quitosano, como hidrogeles de quitosano entrecruzados con glutaraldehído, provocan una mínima reacción inmune que suele cursar con muy poca o ninguna encapsulación fibrosa, con formación de tejido granuloso y una leve aceleración de la angiogénesis en la zona del implante (Azad *et al.*, 2004; Muzzarelli, 2009). Esta reacción inmune desaparece rápidamente sin desarrollar una respuesta inflamatoria crónica y, gracias a su efecto bacteriostático, se favorece la integración del material implantado (Khor y Lin, 2003; Greene *et al.*, 2008).

2.5. APLICACIONES GENERALES.

En la actualidad se conocen unas doscientas aplicaciones diferentes en diversos campos como la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria e incluso en biomedicina. Se comenzaron a emplear en el tratamiento de aguas residuales como quelantes de iones metálicos en la década de los 70 (Rinaudo, 2006; Sandford, 1987).

En la industria alimentaria, el quitosano se emplea frecuentemente como agente floculante para la recuperación de biomasa y nutrientes, ya que reacciona con polímeros aniónicos para formar complejos de polielectrolitos que precipitan, pudiendo ser destruidos o aprovechados. Ambos polímeros se utilizan como ingredientes funcionales, aportando textura y estabilidad a los alimentos mediante el control de la viscosidad, e incrementando el contenido en fibra dietética (Regina *et al.*, 2012).

El quitosano es capaz de preservar y aumentar el tiempo de vida útil de los alimentos gracias a sus propiedades antimicrobianas (Martín-Diana *et al.*, 2009). Este hecho junto con otras propiedades beneficiosas como su carácter antioxidante hace que su uso como aditivo alimentario se haya extendido progresivamente diferentes países como Japón, Corea y Finlandia (Weiner, 1992; Korean Food Drug Administration, 1995). Aunque no se encuentra aprobado por la FDA, en Estados Unidos se comercializa ChitoClear® (Prymex ASA, Norway) que fue reconocido como producto GRAS (del inglés *Generally Recognised As Safe*) en el 2001

(Kean y Thanou, 2010). La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA del inglés European Food Safety Authority), ha evaluado el uso de quitosano en la alimentación y ya se comercializa como atrapador de grasa en formulaciones para reducir el colesterol y el sobrepeso, estando aprobado el consumo de hasta 3 g diarios (UE Nº 432/2012). Se han realizado ensayos clínicos como potenciador de la penetración de fármacos por vía nasal (Singla y Chawla, 2001) y como excipiente farmacéutico (Illum, 1998; Goycoolea *et al.*, 2009). En el 2003 se propuso la inclusión de ambos polímeros, quitina y quitosano, dentro del Codex Alimentario pero actualmente no se encuentra en la lista GSFA (del inglés General Standard for Food Additives) ni ha sido aprobado como ingrediente funcional en la unión europea (Aranaz *et al.*, 2009).

En la agricultura el quitosano y sus derivados se utilizan como recubrimiento de semillas para mejorar la producción en el campo por sus efectos antimicrobianos, por su capacidad de retención de agua y la estimulación de otros microorganismos beneficiosos para el cultivo (Larez-Velásques, 2008).

Dentro del campo de la cosmética, este biopolímero se aplica en la elaboración de cremas para la piel y el cabello. Gracias a su capacidad filmogénica, las películas del polímero interactúan con proteínas y en solución con ácidos orgánicos suaves, aportando cierta viscosidad lo que le permite ser empleado como ingrediente en champús o tónicos capilares. Los derivados solubles en agua como el hidroxipropilquitosano se emplean en cremas para el cuidado de la piel gracias a su capacidad de hidratación, al mismo tiempo sus propiedades antimicrobianas aportan un efecto protector ante infecciones. También existen maquillajes a base de pigmentos y gránulos de quitosano, así como esmaltes de uñas (Dutta *et al.*, 2004).

Tanto en su forma nativa como modificado, el quitosano presenta numerosas aplicaciones en el campo de la biomedicina, gracias a sus propiedades biológicas como actividad antibacteriana (Tokura *et al.*, 1997; Weinhold *et al.*, 2009), hipocolesterolemia (Bokura y Kobayashi, 2003; Liu *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2011), cicatrizante (Rinaudo 2006; Muzzarelli, 2009) y hemostática (Huang *et al.*, 2003; Struszczyk, 2011) resumidas en la Tabla 1.

Además gracias a su similitud con polisacáridos naturales presentes en la propia matriz ósea, como condroitin sulfato, GAGs, o ácido hialurónico, el quitosano se ha utilizado de forma frecuente en la regeneración de cartílago y tejido óseo (Abarrategi *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011).

Tabla 1. Características principales del quitosano y sus aplicaciones en biomedicina.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS	APLICACIONES BIOMÉDICAS
Biocompatible	Suturas
Biodegradable	Implantes dentales
No tóxico	Piel artificial
Agente Hidratante	Reconstrucción de huesos
Fácilmente modelable (filmes)	Lentes de contacto
Mejora la curación de heridas	Material de encapsulación
Actividad contra bacterias y hongos	Sistemas de liberación controlada.

Fuente: Rinaudo 2006. Properties and degradation of selected polysaccharides

Su carácter catiónico lo hace único entre los polisacáridos naturales. En función de la proporción de grupos acetilados y desacetilados presentes en su estructura, se establecerán interacciones de tipo hidrofílicas o hidrofóbicas, actuando así como una molécula anfifílica (Schatz *et al.*, 2003; Kumirska *et al.*, 2011). Cuando la balanza se inclina hacia grupos desacetilados, las aminas libres podrán interactuar con otros grupos cargados de forma negativa como son proteínas, lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, la mayoría presentes en las membranas celulares (Rodrigues *et al.*; 2012).

Este hecho fundamental proporciona al polímero un gran valor farmacéutico ya que actúa como bioadhesivo, y además quimioatrayente de queratinocitos, neutrófilos, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, mejorando la curación de heridas y reduciendo la formación de cicatrices (Muzzarelli, 2009; Mori *et al.*, 2005; Jayakumar *et al.*, 2011). Como consecuencia el quitosano promueve el aumento de la síntesis de colágenos (Kojima *et al.*, 2004), la angiogénesis y la organización del tejido de granulación todos ellos procesos esenciales en la regeneración de tejidos (Santos *et al.*, 2007).

Se considera un buen candidato para el tratamiento de quemaduras debido no solo a las propiedades anteriormente descritas sino también a su capacidad de retención de agua, su permeabilidad al oxígeno y su capacidad de ser degradado de forma natural por las enzimas del cuerpo (Véase algunos ejemplos comerciales en la Tabla 2) (Dai *et al.*, 2011; Jayakumar *et al.*, 2011). Además, también se han estudiado las propiedades del quitosano en relación a la formación de “piel artificial”, compuesta de diferentes materiales en combinación con cultivos celulares que en su conjunto se asemejan a la estructura de este tejido (Mao *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007).

Su posibilidad de uso bajo diferentes formas físicas como filmes (Abarategi *et al.*, 2008a; Jridi *et al.*, 2014), fibras (Choi *et al.*, 2007), hidrogeles (Berger *et al.*, 2004; Bhattarai *et al.*, 2010), micro y nano partículas, micro y nano esferas (Harris *et al.*, 2011), hace que destaque su empleo en el desarrollo de sistemas de liberación controlada, pudiendo ser empleado en diferentes tejidos como la piel, los ojos o el tracto gastrointestinal (Goycoolea *et al.*, 2009).

De forma interesante el quitosano presenta un carácter antibacteriano y antifúngico siendo tóxico frente algunas bacterias (Jumma *et al.*, 2002), hongos (Zuo *et al.*, 2006) y parásitos (Pujals *et al.*, 2008). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual presenta esta actividad antibacteriana, se ha mostrado que el Mw desarrolla un papel fundamental en dicha actividad, destacando que los quitosanos de Mw elevados presentan mayor actividad frente a bacterias.

Tabla 2. Algunos ejemplos comerciales de quitina y quitosano en biomedicina.

NOMBRE ®	DESCRIPCIÓN	APLICACIÓN
Chitodine® (IMS)	Quitosano en polvo mezclado con yodo	Desinfección y limpieza de pieles dañadas y como apósito de heridas
Chitopack®P (Eisai Co.)	Vendaje de quitina dispersa en teraftalato de polietileno, entre otros componentes	Regeneración de piel y tejido subcutáneo Heridas de piel con difícil sutura.
Vulnsorb® (Tesla)	Esponjas liofilizadas de quitosano y colágeno	Recubrimiento de heridas
Traumastat® (Ore-Medix)	Fibras porosas de polietileno rellenas de sílica y recubiertas con quitosano	De uso externo para controlar el sangrado moderado y severo
Tromboguard® (TRICOMED SA)	Múltiples capas, con quitosano, alginato cálcico y sódico, entre otras sustancias	Para el control de la hemostasis local, antibacteriano y acelerador de la curación de heridas

(Fuente Struszczył y Struszczył, 2007)

3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

3.1. INTRODUCCIÓN

Los Sistemas de Liberación Controlada son todos aquellos sistemas capaces de liberar agentes bioactivos a una velocidad y/o en una localización determinada en función de las necesidades de un organismo, durante un período de tiempo específico. Se puede distinguir entre una liberación temporal (siendo la velocidad el factor que controla la liberación), espacial (donde el control se realiza sólo sobre el lugar de liberación) o combinación de ambos.

Los motivos del interés creciente en el desarrollo de estos sistemas de liberación, corroborado con un aumento notable del número de patentes, son de dos índoles muy diferentes. Por una parte, la bioseguridad en la administración del agente terapéutico (Lietchy *et al.*, 2010), pues permite tanto una disminución de la dosis, lo que lleva asociada una menor toxicidad local y sistémica así como un menor número de reacciones adversas. Por otra, de índole económica, pues la disminución de la dosis también implica un menor costo (Mehta *et al.*, 2012).

Cualquier sistema de liberación controlada se encuentra constituido por dos componentes principales, una matriz polimérica y el agente bioactivo a liberar (Langer y Peppas, 1981). La matriz polimérica a su vez puede actuar fundamentalmente de dos formas diferentes: como el agente transportador del principio activo, que se encuentra disperso en él (bien en todo su seno, bien en su superficie), o como el agente protector de la liberación de dicho principio activo, encapsulándolo y produciendo el intercambio entre el reservorio del mismo (core) y el medio externo, por fenómenos de difusión a través del polímero actuando como membrana semipermeable (Luginbuehl *et al.*, 2004; Lietchy *et al.*, 2012).

Se han desarrollado numerosos biomateriales basados en quitosano como sistemas de liberación controlada, mostrando en todo momento propiedades adecuadas para este fin (Lee *et al.*, 2002). El quitosano permite no solo la liberación controlada de factores de crecimiento sino también la encapsulación de los mismos, protegiéndolos de procesos de degradación en el organismo (Lee *et al.*, 2004). Los hidrogeles derivados de este polímero se emplean con frecuencia como sistemas de liberación controlada ya que sumado a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad, presenta una gran capacidad de reabsorción de agua (Bhattarai *et al.*, 2010).

Un punto crítico en la caracterización de cualquier sistema de liberación controlada es la determinación de la cinética de liberación del compuesto bioactivo que transporta. Si se considera todos los posibles procesos que pueden tener lugar en un sistema de liberación

controlada, se puede distinguir:

- Hidratación y equilibrado de la matriz con el fluido biológico circundante (fenómeno de hinchamiento).
- Disolución del agente bioactivo, tanto si éste se encuentra disperso como si se encuentra encapsulado formando un núcleo rodeado por la matriz polimérica.
- Difusión del agente bioactivo fuera de la matriz polimérica.

Simultáneamente a estos procesos puede darse asimismo un fenómeno de disolución de la matriz polimérica por fenómenos fisicoquímicos (pH, hidrólisis de enlaces, etc) y/o degradación mediante enzimas, específicas o inespecíficas. En ambos casos el proceso de disolución/degradación puede ser de forma heterogénea cuando ocurre en la superficie del material que está en contacto con el medio fisiológico, o una degradación homogénea, lo que supone un deterioro aleatorio en toda la masa de la matriz polimérica. En esta última, el peso molecular del polímero decrece de forma continua, manteniendo su forma original hasta que el polímero sufre una considerable degradación, alcanzando un peso molecular crítico, y en ese momento, comienza la solubilización y pérdida de masa (Tamada y Langer, 1993).

Todos estos fenómenos pueden ocurrir de manera simultánea produciéndose por lo tanto, un fenómeno de liberación extremadamente complejo (Figura 12).

Se han desarrollado numerosas ecuaciones que intentan explicar mediante desarrollos matemáticos la liberación de los compuestos en función del tiempo y desde diferentes soportes. Los modelos empíricos se basan en el ajuste de los datos experimentales de forma directa mientras que los modelos mecanicistas se basan en modelos teóricos para describir el comportamiento de liberación. Entre ellos destaca la cinética de orden cero, la cinética de primer orden, el modelo de Higuchi (cinética de la raíz cuadrada), de Hixon y Crowell (modelo de la raíz cúbica) el modelo de Korsmeyer-Peppas (ley de la potencia) y modelo para sistemas hinchables (Higuchi, 1963; Hixon y Crowell, 1931; Peppas *et al.*, 1980; Peppas, 1981; Peppas y Korsmeyer, 1982).

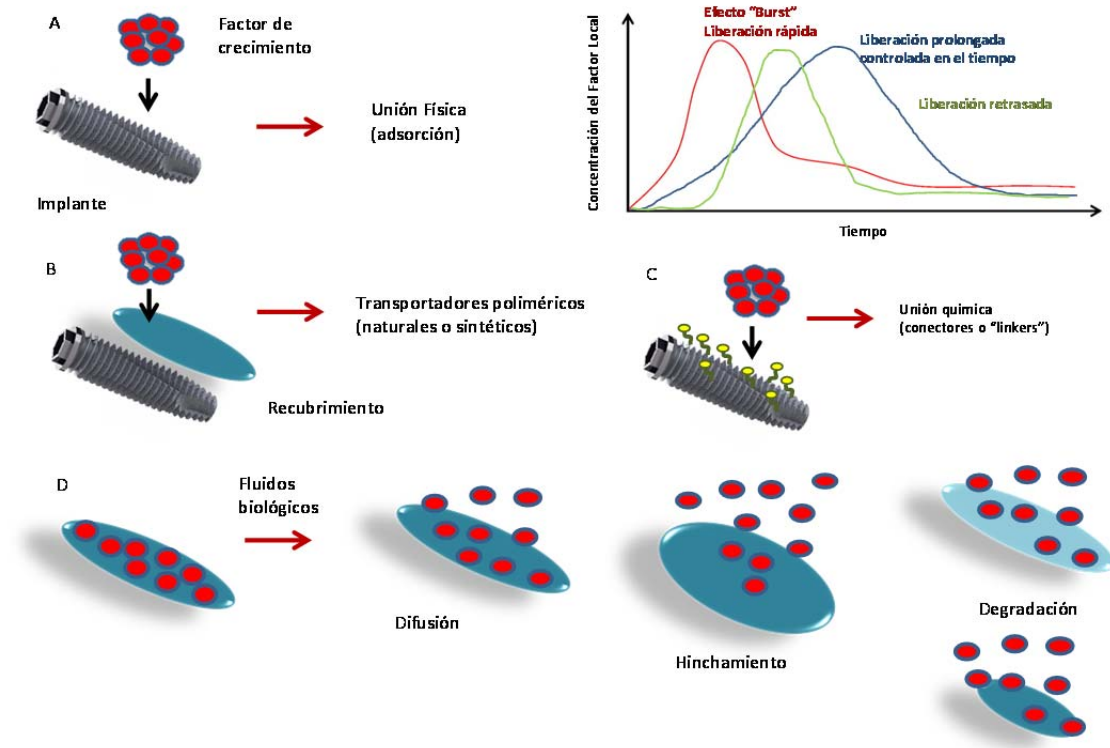


Figura 12. Liberación de GF en aplicaciones biológicas. A) Los GF pueden estar adsorbidos a implantes presentando una cinética de liberación rápida y con un llamativo efecto "burst" o estallido. B) Se consigue retrasar la liberación mediante modificaciones químicas de la superficie del biomaterial (empleando conectores o "linkers"). C) Recubrimientos poliméricos controlan la liberación de los GF manteniendo una concentración local sostenida en el tiempo. D) La liberación de GF desde matrices poliméricas puede tener lugar por diferentes procesos, difusión, hinchamiento y degradación, que a su vez pueden coincidir en el tiempo en función del polímero empleado.

3.2. OBTENCIÓN Y APLICACIONES DE FILMES DE QUITOSANO EN BIOMEDICINA

El quitosano se ha empleado como sistema de liberación controlada para multitud de compuestos, existiendo en la actualidad una amplia gama de productos basados en filmes, de aplicación en biomedicina. En la Figura 13, se muestran tres tipos de filmes, obtenidos mediante diversos métodos (evaporación de solvente, inmersión, electrodeposición, pulverización, etc), donde el quitosano de partida puede ser empleado de forma directa o modificando su estructura con entrecruzantes u otros compuestos (Mengatto *et al.*, 2012).

Un filme tipo matriz se encuentra constituido básicamente por una capa de quitosano que sirve de transportador de un factor activo el cual para liberarse deberá difundir a través de la barrera polimérica. Como ejemplos, se destaca la encapsulación y liberación de diferentes agentes terapéuticos como antibióticos, antiinflamatorios, factores de crecimiento (Mizuno *et al.*, 2003), agentes hemostáticos y antitrombóticos

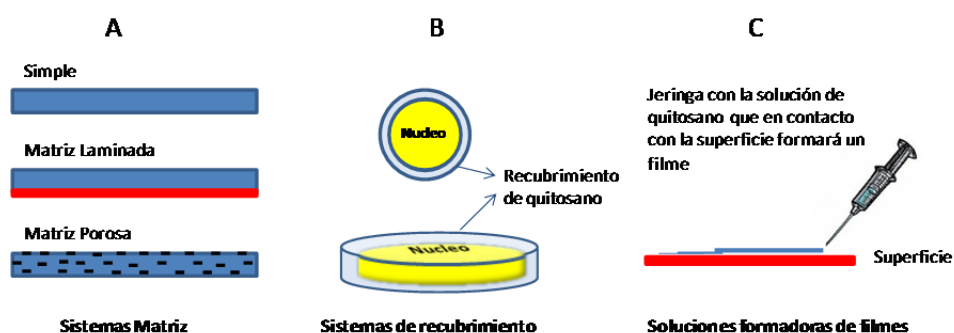


Figura 13. Diferentes preparaciones de filmes de quitosano con aplicación en medicina (Fuente Mengatto *et al.*, 2012).

Existen diferentes tipos de matrices, desde matrices simples que pueden llevar las moléculas activas disueltas en la solución de polímero, dispersa o precipitada en la misma, hasta sistemas laminados, o porosos (Figura 13-A). Las principales ventajas que presentan son su fácil preparación y su gran resistencia a fracturas grietas o perforaciones evitando así la liberación repentina de agentes activos cómo puede suceder en los sistemas de recubrimiento (Langer, 1980).

Los sistemas de recubrimiento están constituidos por un núcleo que contiene el factor bioactivo recubierto por una membrana de quitosano, que protege y controla la velocidad de liberación (Figura 13-B). Estos sistemas son frecuentes en los medicamentos orales recubiertos donde, en función del pH, la membrana de quitosano controla la liberación del principio activo en el sitio de acción, ya que es insoluble a pH neutro y soluble en medios ácidos.

Finalmente mencionaremos, por su características de uso, un tipo especial de filme tipo matriz de quitosano portadora de moléculas activas, solubles o dispersas (Figura 13-C). La diferencia con los anteriores radica en su preparación, que es *in situ* en la zona de tratamiento por evaporación directa de la solución polimérica. Se emplea de forma frecuente como un tejido sellador en procedimientos médicos y quirúrgicos (Abrahams *et al.*, 2009). Este sellador, biodegradable y biocompatible, es un hidrogel formado por gelificación de una premezcla de quitosano o derivados, que suelen ir acompañados de antibióticos o antiinflamatorios, los cuales son incorporados al tejido mediante el uso de jeringuillas o pipetas. Se suele aplicar en el cierre o como refuerzo de una sutura, en la reparación de heridas e incluso en el tratamiento de la enfermedad degenerativa del disco (Tan *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2013).

4. REGENERACIÓN DE TEJIDOS ÓSEOS

4.1 INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es un tejido único capaz de autorrepararse a sí mismo de manera completa por medio de la reactivación de los procesos que tienen lugar durante la embriogénesis. Ante una lesión ósea, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos pequeños, no obstante, para pérdidas masivas de masa tisular se hace necesario recurrir al aporte de sustitutos óseos para reparar el tejido.

Se denominan sustitutos óseos a todos los tejidos o materiales que pueden emplearse para rellenar defectos del hueso, con el objetivo de regenerar y reparar el tejido óseo. De acuerdo con esto podemos reconocer dos tipos fundamentales de sustitutos, los injertos óseos, que corresponden a fragmentos de hueso natural implantables y los biomateriales, diseñados y manufacturados para mimetizar algunas de las propiedades intrínsecas del hueso natural.

El material idóneo para el tratamiento de lesiones de hueso es el mismo tejido óseo, ya sea proveniente del propio paciente (autoinjerto) o bien de un individuo donante de la misma especie (aloinjerto). El autoinjerto óseo esponjoso es probablemente el mejor procedimiento en el tratamiento de fracturas óseas gracias a su gran poder osteogénico y a la ausencia de situaciones de rechazo. No obstante presenta ciertas limitaciones como pueden ser la reducida cantidad de tejido óseo disponible, la problemática asociada a su obtención, es decir, la potencial morbilidad del sitio donador, la prolongación del tiempo de hospitalización, riesgo de infección y dolor postoperatorio (Lo *et al.*, 2012).

Para solventar alguno de sus problemas se han desarrollado numerosos biomateriales (anteriormente comentados) que tratan de imitar la reparación del defecto óseo de forma natural, de ahí que sea clave el estudio y entendimiento de las funciones y componentes de tejido óseo a reparar (Mehta *et al.*, 2012).

4.2 CARACTERÍSTICAS, COMPONENTES Y FUNCIONES

El hueso es un tipo de tejido conectivo especializado de origen mesodérmico cuya composición y organización le permiten desarrollar una función mecánica de sostén y participar en la homeostasis mineral. Es un tejido único en cuanto a su gran resistencia y fortaleza al mismo tiempo que es ligero y presenta cierta elasticidad. Se trata de un tejido dinámico que cambia con las fuerzas que soporta.

El principal componente del tejido óseo son los minerales que llegan a constituir un 45% del total, seguido de un 30% de materia orgánica (tipo colágeno y otras proteínas) y un 25% de agua. Los componentes inorgánicos, como las sales de fosfato y carbonato de calcio, son muy abundantes en este tejido, y se van intercambiando durante el proceso de remodelación ósea. La formación de hueso se encuentra regulada no sólo mediante la acción de diversas hormonas sino también a través de la dieta.

Las principales funciones del tejido óseo son la protección de órganos vitales aportando resistencia frente a golpes. Dentro de las funciones mecánicas también se encuentra la de sostén de los tejidos y órganos y la función locomotora. Dentro de las funciones metabólicas el tejido óseo actúa como depósito de iones (calcio y fosfato) y de factores de crecimiento en la matriz ósea mineralizada (BMPs o TGF- β). En los huesos también se regula el metabolismo de fosfato mediante la liberación de FGF, que actúa sobre los riñones disminuyendo la reabsorción de iones fosfato. Además las células óseas liberan una hormona, denominada Osteocalcina, que contribuye a la regulación de la glucosa en sangre y la deposición de grasa. Por último englobando a las funciones sintéticas, destaca la función hematopoyética, que tiene lugar en la médula ósea roja, dentro del tejido óseo esponjoso, la cual se encarga de la formación de células sanguíneas.

Existen diferentes tipos de huesos que se clasifican según su forma. Los huesos largos, de forma cilíndrica, alargada, presentan una parte central o cuerpo y dos extremos proximal y distal, como por ejemplo el fémur y el húmero. Los huesos cortos presentan forma cuboide, como son los huesos de los dedos, (tarsos) y rótula. Los huesos planos como la escápula u omoplato. Por último los huesos irregulares como vértebras o falange distal.

4.2.1. Estructura macroscópica del tejido óseo

Macroscópicamente, el tejido óseo en el adulto se organiza bajo dos formas arquitectónicas distinguiéndose dos tipos de tejido, el tejido óseo esponjoso y el compacto (Figura 14).

El tejido esponjoso, también denominado reticular, constituye el 20% del tejido óseo total. Presenta una estructura esponjosa con porosidad elevada, variable entre un 50 y el 90%, y se caracteriza por la presencia de trabéculas óseas que se localizan en la epífisis de los huesos largos y en el interior de los huesos cortos y planos. En el interior de las trabéculas se encuentran los osteocitos y entre las mismas trabéculas se localiza la médula ósea roja (la cual sintetiza las células hematopoyéticas).

En cambio el tejido óseo compacto o cortical, supone cerca del 80% del total de hueso y se localiza en la diáfisis (zona central y alargada de los huesos largos) (Sikavitsas *et al.*, 2001). Este tejido es sólido (con una porosidad inferior al 10%) y se encuentra constituido por una masa compacta y continua cuya matriz mineralizada se dispone en laminillas. Entre las laminillas se sitúan los osteocitos, formando la estructura denominada Sistema de Havers u Osteona. Dicho sistema se compone fundamentalmente del canal de Havers, que contiene el vaso sanguíneo, la arteria y el nervio, que pasa por el agujero nutricio del hueso. Los canaliculos calcóforos, comunican los osteocitos entre sí y permiten la entrada de nutrientes y la eliminación de desechos de los mismos (Baron, 2003)

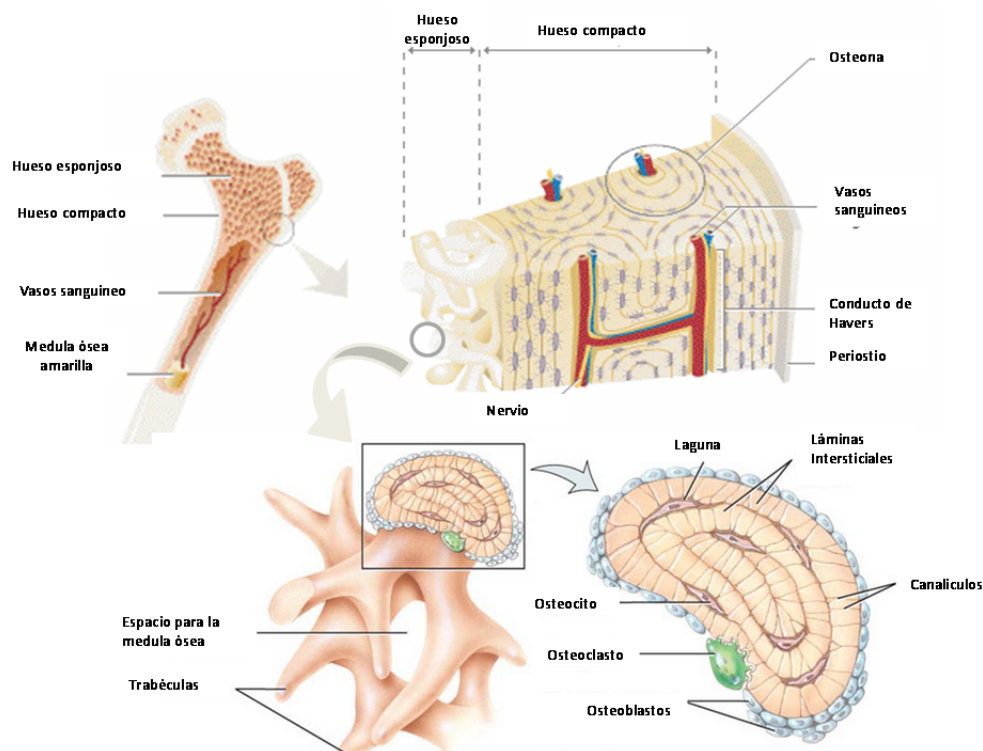


Figura 14. Imagen del tejido óseo esponjoso y compacto y los diferentes elementos que los componen (Fuente González Prada, J.M. web www.alimenta.com).

Cada osteona se encuentra limitada por una línea de cemento, que es una fina capa de matriz ósea sin vascularización y pobre en fibras de colágeno. Las osteonas a su vez se comunican entre sí mediante los Conductos de Volkman.

El periostio es la envoltura conectiva que rodea al hueso y está formada a su vez por dos capas, una fibrosa compuesta por fibras de colágeno y fibroblastos, y otra capa osteógena, la cual contiene los osteoblastos.

El tejido óseo esponjoso se encarga de las demandas metabólicas y el tejido óseo cortical del soporte y la integridad mecánica.

Se conocen dos tipos de osificaciones, la intramembranosa donde el tejido conectivo se empieza a crear de forma directa desde el tejido conectivo primitivo del feto (mesénquima), es decir las MSC se diferencian directamente a células osteoprogenitoras y éstas a su vez en osteoblastos. Este proceso tiene lugar preferiblemente en huesos planos y mandíbula.

Otra vía, más indirecta, transcurre mediante una osificación endocondral. En ella se forma hueso a partir de un cartílago hialino debido a la diferenciación de las MSC hacia condroblastos y éstos sintetizan ECM y colágeno. Más tarde esta matriz se osifica y se forma tejido óseo maduro. Dicho proceso es más frecuente en los huesos largos (Rengachary, 2002).

4.2.2. Estructura microscópica del tejido óseo

El tejido óseo es una variedad de tejido conectivo compuesto por una matriz ósea mineralizada, que representa un 98% del total de hueso, y en ella se encuentran las células que lo secretan (que constituyen el 2% restante).

La matriz ósea mineralizada es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso. Está formada por dos fases, llegándose a considerar el propio tejido óseo como un material compuesto, una fase orgánica y otra mineral (Salgado *et al.*, 2004). La fase orgánica se encuentra constituida mayoritariamente por fibras de colágeno tipo I orientadas (en una dirección preferencial formando parte del osteoide), por proteínas no colágenas (osteocalcina, osteonectina, fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento, proteínas séricas), por glicosaminoglicanos (condroitinsulfato, queratansulfato, ácido hialurónico) y lípidos (Wiesmann *et al.*, 2005). En cambio la fase mineral se encuentra formada por iones de fosfato cálcico depositados en forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) entre las fibras de colágeno además de contener otros elementos como carbonatos, citratos, magnesio, sodio y potasio (Gartner y Hiatt, 2002).

La ECM presenta varias funciones, actuando no solo como soporte físico para la adhesión y orientación de las estructuras celulares, sino también como mediador de señalización intracelular e intercelular a través de los receptores de la superficie de las células. Las interacciones mediadas entre las células y la matriz que las rodea es bidireccional y dinámica, es decir las células reciben señales de la matriz (que actúa como reservorio de factores) y la matriz se moldea por acción de la respuesta celular. Dichas interacciones no son sólo de origen bioquímico, como las establecidas entre las proteínas de la membrana celular y la ECM, sino también biomecánico, como ocurre en el tejido óseo donde la carga que se

soporta es un factor a tener en cuenta en su regeneración.

Existen diferentes tipos de células que se encuentran dispersas en la ECM resumidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Tipos celulares del tejido óseo

TIPO CELULAR	FUNCIÓN	MARCADORES	ORIGEN
Osteoprogenitoras	Elevado potencial proliferativo Diferenciación hacia linaje osteoblástico	ALP Osteopontina Osteocalcina Colágeno tipo I Sialoproteína	Mesenquimal
Osteoblastos	No proliferativas, De elevada diferenciación. Mineralización de hueso	ALP Osteopontina Osteocalcina Sialoproteína	Mesenquimal
Osteoclastos	Resorción de hueso Señalización osteoblástica para formar hueso	Ac. Fosfato tartrato resistente	Hematopoyético

Las células osteoprogenitoras son las células madre mesenquimales (MSC del inglés *Mesenchymal Stem Cell*) no hematopoyéticas del tejido adulto. Las MSC son células pluripotenciales que poseen un gran potencial de diferenciación en osteoblastos y otros fenotipos mesenquimales dependiendo del entorno tales como fibroblastos, condrocitos y adipocitos (Bielby *et al.*, 2007). Se localizan en la porción interna del periostio, en el endostio y en los conductos internos de los huesos que contienen vasos sanguíneos. Presentan una morfología espigada, con un núcleo alargado, y un citoplasma con abundantes ribosomas y un escaso y pobre Aparato de Golgi. Estas células son más activas durante el periodo de crecimiento óseo intenso y no expresan fosfatasa alcalina, hasta que han adquirido el compromiso de diferenciación hacia el linaje osteoblástico (Bozal, 2006).

Las células osteoprogenitoras no solo actúan como fuente de progenitores de los osteoblastos sino que tienen una función indirecta en la homeostasis normal del esqueleto, regulando la osteoclastogénesis a través de la expresión de los factores RANKL y OPG (Imai *et al.*, 2013). Asimismo desempeñan también un papel importante en la reparación de fracturas o daño óseo. Se ha demostrado que las moléculas de señalización que coordinan la cascada de reparación pueden regular la actividad celular de las MSC y otros linajes progenitores, induciendo la proliferación celular y la diferenciación *in vitro*, lo que conduce a la cura de fracturas y el restablecimiento de la integridad del esqueleto (Bielby. *et al.*, 2007).

Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar matriz ósea y por lo tanto del mantenimiento de la arquitectura esquelética. Se trata de células cuboidales, de núcleo redondo y citoplasma basófilo, que se localizan principalmente en el periostio y endostio bajo la forma de una monocapa adherente. Presentan un aparato de Golgi desarrollado, característico de células secretoras, en este caso secretan lípidos, fosfolípidos y proteínas de la matriz ósea, entre las que destaca la enzima fosfatasa alcalina (ALP), la nucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP1/PC-1), colagenasas, anexinas, y metaloproteinasas de la matriz. Estas proteínas desarrollan un papel indispensable en el control de la mineralización ósea. Las enzimas ALP y NPP1 presentan una actividad antagonista entre ellas regulando el inicio de la calcificación. La enzima NPP1 incrementa la concentración de pirofosfato (PPi), el cual inhibe el proceso de calcificación ósea, mientras que la actividad ALP, disminuye la concentración de PPi, aumentando la presencia de fosfato inorgánico (Pi), promotor de la mineralización y por lo tanto de la creación de depósitos de sales minerales (Boskey *et al.*, 2006). Las proteínas y fosfolípidos van a actuar como sitios para el depósito de hidroxapatita (Bozal, 2006). Además de los productos anteriormente mencionados, los osteoblastos generan varios productos celulares, entre los que incluyen la enzima colagenasa, hormonas como la osteocalcina, proteínas extracelulares estructurales como osteonectina, fibronectina, vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea, así como también factores de crecimiento, proteoglicanos, proteínas implicadas en la adhesión celular y colágeno, mayormente colágeno tipo I.

La formación de hueso *in vitro* cursa con diferentes etapas que básicamente consisten en la proliferación de osteoblastos y síntesis de matriz ósea. A continuación, cambios en la composición y organización promueven la maduración de dicha matriz y por último, se forman depósitos de hidroxapatita que conducen a la mineralización de la misma (Stein y Lian, 1993). Durante todo este proceso, tiene lugar la activación de una serie de genes específicos que transcriben proteínas asociadas con la matriz como colágeno tipo I, fibronectina, osteonectina y diversos factores de crecimiento en la etapa de proliferación. Posteriormente, durante la maduración de la matriz se comienza a detectar la fosfatasa alcalina alcanzando niveles máximos en la diferenciación osteoblástica. Por último, durante la mineralización se produce la activación de glicoproteínas tales como la osteocalcina y la osteopontina.

Los osteoblastos se diferencian finalmente en osteocitos (osteoblastos maduros), que se encuentran totalmente embebidos en la matriz ósea en el interior de las lagunas mineralizadas y son incapaces de dividirse. Presentan un citoplasma ligeramente alargado y basófilo, con un aparato de Golgi poco desarrollado y numerosas prolongaciones citoplásmicas que, a través de pequeños canalículos, comunican con otros osteocitos. No

obstante, mantienen las actividades celulares diarias del tejido óseo (como el intercambio sanguíneo de nutrientes y desechos) e incluso participan en la activación local del remodelado óseo. El destino final de estas células es ser reabsorbidas por los osteoclastos, tras su apoptosis (Bozal, 2006).

Los osteoclastos son células de gran tamaño, móviles, ampliamente ramificados procedentes de la fusión de células mononucleadas (monocitos y macrófagos) que, a su vez, provienen de células madre hematopoyéticas. Se concentran de forma aislada en el endostio, en cavidades poco profundas denominadas Lagunas de Howship y se caracterizan por la presencia de un borde en cepillo. Su principal función se centra en el control de la homeostasis del calcio mediante la resorción del hueso. Producen enzimas lisosómicas de dos tipos, colagenasas y cisteínproteinasas, como la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) y además poseen anhidrasa carbónica, la cual es utilizada en la producción de iones de hidrógeno (H⁺) secretados al borde en cepillo (Boyle *et al.*, 2003).

Los osteoclastos reabsorben el hueso en dos fases, primero disuelven la fase mineral liberándose iones Ca²⁺ (debido a una disminución del pH) y segundo por una degradación enzimática de la fase orgánica (mediante metaloproteinasas y cisteinproteinasas) hasta que los osteoclastos mueren por apoptosis (Baron, 2003). Todo el conjunto celular se comunica de forma indirecta mediante intermediarios químicos, factores paracrinos y factores de unión a la matriz (Boyle *et al.*, 2003).

4.2.3. Remodelación ósea

Se conoce el modelaje o crecimiento óseo como el conjunto de procesos que tiene lugar durante el crecimiento corporal en tamaño y forma del hueso, englobando de esta manera la remodelación ósea. Se trata de un mecanismo complejo por el cual el hueso se renueva constantemente, en un proceso coordinado de formación y resorción, adaptándose a los cambios y cumpliendo su función de reservorio de calcio (Hill *et al.*, 1998). En ningún momento el hueso cambia de forma, ya que la resorción y formación ósea tiene lugar en el mismo sitio, denominado unidades multicelulares básicas (BMUs del inglés *Bone Multicellular Unit*) donde pequeños grupos de células actúan de forma coordinada produciendo nuevo tejido conocido como unidad estructural ósea (BSU del inglés *Bone Structural Unit*) (Frost, 1991).

El mantenimiento de la masa ósea requiere un equilibrio entre la formación de hueso por los osteoblastos y la reabsorción por los osteoclastos (Dunstan y Pyvonka, 2012). Para ello ambos procesos se encuentran regulados por distintos tipos celulares (osteoblastos y

osteoclastos) y diversos factores que controlan y dirigen la acción celular como hormonas (calcitonina, la hormona paratiroidea (PTH), 1,25- dihidroxivitamina D, hormonas sexuales y otras hormonas esteroides), hidroxiapatita, moléculas de la ECM, factores locales (citoquinas, factores de crecimiento), iones, vitaminas, efectos de la carga mecánica en el esqueleto, e incluso factores genéticos (Papachroni *et al.*, 2009).

El proceso de remodelación ósea, representado de forma simplificada en la Figura 15, se inicia en la fase de reposo con la activación de los precursores de osteoclastos, los cuales migran y se diferencian. En esta fase de resorción los osteoclastos diferenciados destruyen cierta cantidad de hueso y al finalizar entran en apoptosis. Como consecuencia de la resorción ósea se liberan al medio iones de calcio, proteínas de matriz y factores de crecimiento que a su vez actúan como activadores de la regeneración de la misma matriz, es decir, activan la diferenciación de las células osteoprogenitoras hacia la formación de osteoblastos, encargados de sintetizar nuevo hueso y comenzando así la fase de reversión. Además el osteoblasto produce osteoprotegerina, que inhibe la osteoclastogénesis. A continuación tras la fase de formación, los osteoblastos maduran a osteocitos y se integran en la matriz que a su vez se mineraliza, entrando de nuevo en la fase de reposo.

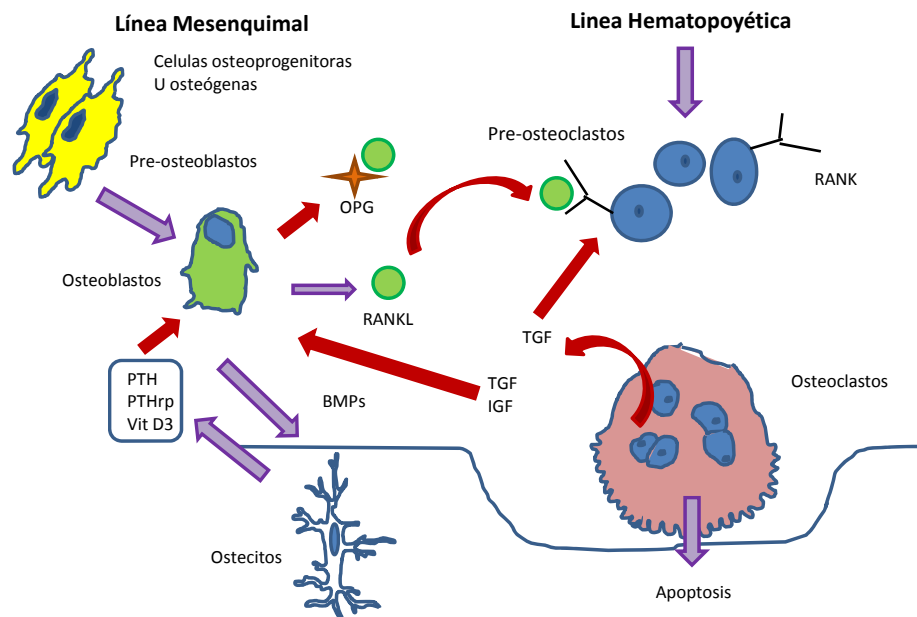


Figura 15. Proceso de remodelación celular. Se inicia con la diferenciación de los precursores de osteoclastos y la acción de los mismos. Como consecuencia de la resorción se liberan al medio factores que activan la diferenciación de precursores de osteoblastos. Mientras los osteoclastos entran en apoptosis, los osteoblastos sintetizan la nueva matriz. Posteriormente se diferencian a osteocito y permanecen en reposo hasta el siguiente ciclo de remodelado.

4.2.4. Reparación o Consolidación ósea

Los traumatismos son una de las principales causas de disfunción del tejido óseo. Una fractura se define como una discontinuidad del tejido óseo como consecuencia de una sobrecarga o procesos patológicos. La consolidación ósea es el proceso de reparación que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas. El proceso de consolidación ósea comienza con la estabilización de los callos endóstico y perióstico, proceso que restablece la continuidad de la fractura. Existe una consolidación primaria, más directa, sin necesidad de formación de callo perióstico. Este proceso tiene lugar en condiciones de estabilidad óptima (reducción anatómica y compresión interfragmentaria) en fracturas cuyos extremos estén en contacto y empleando una fijación rígida.

Si en la siguiente fase que corresponde al establecimiento de una unión ósea, o desde un principio, la fractura no presenta estabilidad mecánica, se puede generar una pseudoartrosis hipertrófica. Sin embargo, el proceso tolera un pequeño margen de movimiento que a su vez estimula la reparación ósea. Por último, tiene lugar procesos de remodelación en el tejido óseo neoformado, cuya finalidad es aportar la resistencia inicial del tejido sano.

Por lo tanto se distinguen tres fases fundamentales que constituyen el proceso de reparación ósea, y que se solapan en el tiempo. Además hay que tener en cuenta que durante una fractura ósea se ven afectadas no solo las células del propio tejido sino también otros tejidos adyacentes como vasos sanguíneos y tejido muscular (Figura 16).

La fase inflamatoria se inicia en el momento en que se produce la fractura y su duración es aproximadamente de un par de semanas, dependiendo de las condiciones fisiológicas. El pH normal de la sangre y de los fluidos intersticiales oscila entre valores de 7,35-7,45. Sin embargo durante este periodo exudativo, el pH sanguíneo disminuye, alcanzando valores de 5,2 (Liu *et al.*, 2004). En esta etapa tiene lugar la formación de un coágulo y la consiguiente aparición de un hematoma (Figura 16-A). Gracias a un aumento de la vasodilatación y de la permeabilidad vascular se favorece la migración de células osteoprogenitoras procedentes del periostio y de la médula, la activación de plaquetas para la formación del coágulo y células del sistema inmune (como leucocitos granulocitos y macrófagos).

Una vez establecido el coágulo, el aporte de oxígeno y los nutrientes disminuye, activándose la liberación de diferentes factores, PDGF y TFG- β . Este hecho promueve la diferenciación de las MSC en células osteoprogenitoras las cuales se diferencian a su vez en osteoblastos (sintetizadores de la matriz ósea). Tras esta fase de reparación el pH de la zona se torna neutro debido a la desaparición del proceso inflamatorio y a la recuperación del riego

sanguíneo. Desde los extremos de la fractura comienza la reabsorción del tejido necrosado por los osteoclastos lo que permite que los vasos del periostio aporten los brotes vasculares que inician la reparación y formación de un callo blando (Figura 16-B). En este estadio se alcanzan niveles máximos de actividad fosfatasa alcalina favoreciendo el inicio de la mineralización del callo óseo (Braddock, *et al.*, 2001).

Las MSC del foco de fractura y del torrente sanguíneo son las responsables de la neoformación ósea. La composición del callo óseo varía en función de la fase de regeneración ósea, las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa que contiene colágeno tipo I y III, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. A continuación, el tejido fibroso se transforma en fibrocartílago con alto contenido de colágeno tipo II y proteoglicanos específicos. En la fase final de la mineralización, se concentra colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y proteínas no colágenas que concluyen con la osificación del callo óseo inmaduro (Figura 16-C).

Por último, existe una fase de remodelación donde el hueso inmaduro se transforma en hueso laminar. En esta etapa, los osteoclastos reabsorben las trabéculas mal orientadas y las sustituyen por otras nuevas adaptadas a las líneas de fuerza. Una vez que se ha reemplazado todo el hueso neoformado y finaliza la remodelación del callo óseo, el tejido recupera las propiedades mecánicas originales del hueso (Figura 16-D).

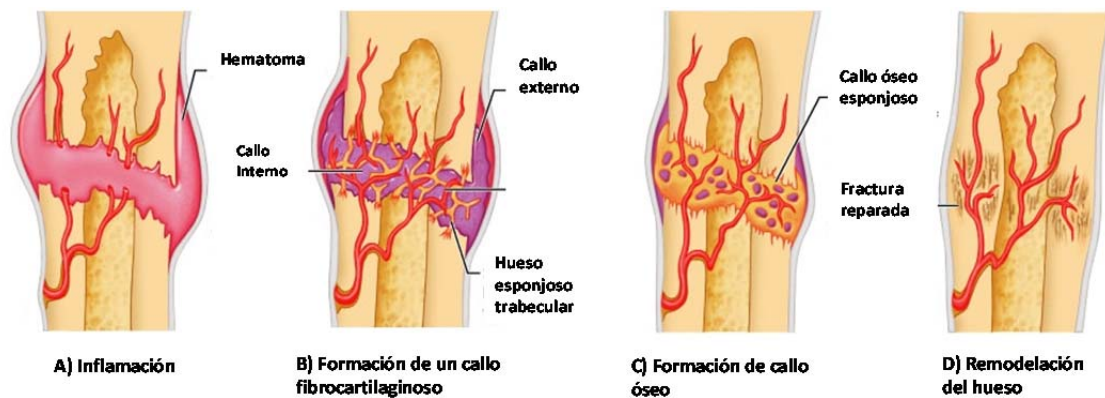


Figura 16. Etapas de la reparación de una fractura ósea. Formación de un hematoma seguido de un proceso inflamatorio, una angiogénesis localizada y vascularización. Se forma un callo fibrocartilaginoso que se mineraliza convirtiéndose en un callo óseo esponjoso. Se sintetiza ECM y se finaliza con el remodelado óseo (Braddock *et al.*, 2001).

4.3. EXPERIMENTACION *IN VITRO* DE QUITOSANO EN LA REGENERACIÓN ÓSEA.

La presencia de un biomaterial en las inmediaciones del tejido biológico va a influir en ese tipo de interacciones celulares y modificará la regulación de los diferentes procesos que participan en la recuperación del tejido.

Si ese biomaterial es biocompatible, biodegradable y no tóxico, la posibilidad de éxito del implante en el tejido será mayor, disminuyendo la probabilidad de situaciones de rechazo y de procesos infecciosos que dificulten la regeneración del tejido en cuestión.

Una técnica frecuente que permite estudiar dichas interacciones células-biomaterial son los cultivos celulares *in vitro*. Dichos experimentos no reproducen todo el abanico de respuestas celulares observadas *in vivo*, ya que las condiciones de los cultivos son determinadas por el investigador, pero constituyen una primera aproximación muy necesaria para evaluar las interacciones célula-biomaterial y la biocompatibilidad del mismo. De ahí surge la necesidad de diseñar de forma activa la superficie del implante, favoreciendo la interacción con la membrana celular y así facilitar los procesos de adhesión y proliferación, de forma similar a como se produce el proceso natural.

Como hemos descrito anteriormente, las interacciones establecidas entre las células y la ECM son la base de todas las señales fisicoquímicas y biológicas que desencadenan y reorganizan los diferentes procesos celulares. Las interacciones adhesivas son críticas para la adhesión celular e influyen en la reorganización de la morfología celular, afectando de forma directa a la proliferación, migración, diferenciación y promoviendo la supervivencia celular.

Durante el proceso de adhesión celular, se distinguen varias etapas que abarcan desde la formación de contactos iniciales hasta el inicio de la proliferación celular (Figura 17). El anclaje celular tiene lugar mediante diferentes tipos de interacciones y mecanismos celulares y participa en diversos procesos como el desarrollo embrionario, la migración celular, la inflamación, el desarrollo de tumores, etc.

Los mecanismos que controlan este reconocimiento pueden ser inespecíficos (fuerzas electrostáticas, de Van der Waals) o mediante uniones específicas, las cuales tienen lugar a través de las moléculas de adhesión celular y proteínas de la ECM e incluso con receptores de otras células adyacentes o vecinas.

El quitosano ha demostrado ser citocompatible permitiendo una buena adhesión y proliferación celular. Además gracias a su estructura análoga a los glucosaminoglucanos GAGs, localizados en el tejido conectivo de la ECM (como la heparina, condroitin sulfato, ácido hialurónico) mantiene las interacciones específicas con receptores de factores de crecimiento y proteínas de adhesión (Neamark *et al.*, 2007; Muzzarelli, 2009).

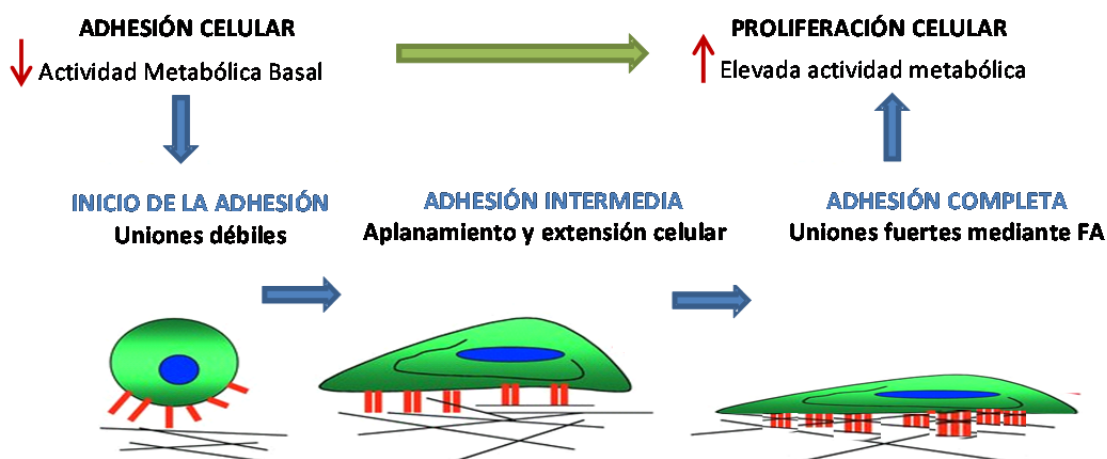


Figura 17. Etapas del proceso de adhesión celular. Inicialmente tiene lugar la formación de contactos débiles a través del reconocimiento superficial celular. En estadios intermedios aumenta el número de interacciones y la fuerza provocando el aplanamiento y extensión de las células. Por último, se desarrollan puntos de adhesión focal, (FA, del inglés *Focal Adhesión*), uniones de gran fuerza, momento en el que se inicia la proliferación celular (Fuente Murphy-Urlich, 2001).

Tanto el Mw como el DD influyen de forma decisiva en las propiedades biológicas del filme de quitosano. Numerosos ensayos *in vitro* realizados con diferentes tipos celulares, han corroborado la estrecha relación entre el DD y su influencia en la proliferación celular. Así quitosanos con elevado DD conllevan a un aumento de la adhesión y por lo tanto de la proliferación celular en determinados tipos celulares, endoteliales, fibroblastos, keratinocitos, osteoblastos y condrocitos (He *et al.*, 2011; Hamilton *et al.*, 2006; Bumgardner *et al.*, 2007; López-Lacomba *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2014; Klokkevold *et al.*, 1996; Lahiji *et al.*, 2000; Haipeng *et al.*, 2000; Noriega y Subramanian, 2011). No obstante existen ciertas controversias con respecto a la mejora de la proliferación celular en función de la línea celular seleccionada como por ejemplo en el caso de los fibroblastos, la cual parece no verse afectada por la presencia de polímero (Fakhry *et al.*, 2004).

DD elevados conllevan a la presencia de mayor número de cargas positivas en superficie lo cual conduce a un incremento en la adsorción de proteínas de ECM (laminina, fibronectina) sobre filmes de quitosano que a su vez promueven y facilitan la adhesión de células celular (Freier *et al.*; 2005; Bumgardner *et al.*, 2003a; Busilachi *et al.*, 2013).

Por otro lado se ha descrito que filmes de oligómeros de quitosano (cerca de 1400 Da) mejoran la adhesión y diferenciación de células adiposas y de médula ósea y en comparación con filmes de quitosanos de elevado Mw (Muzzarelli y Muzzarelli, 2005).

La superficie del material va a influir sobre los procesos celulares determinando el tipo y fuerza de unión con el sustrato (Liu *et al.*, 2004). Los parámetros superficiales van a participar en la adsorción y conformación de proteínas, influyendo así en los procesos de adhesión celular y en la expresión de un fenotipo celular determinado. La rugosidad del filme es por lo tanto un factor importante a determinar ya que puede favorecer las interacciones adecuadas celulares. Estudios *in vitro* señalan que la adhesión celular mejora sobre superficies de mayor rugosidad, ya que las interacciones necesarias para el anclaje celular tienen lugar con mayor facilidad (Bumgardner *et al.*, 2003b).

Las interacciones necesarias para la adecuada adhesión y proliferación celular dependerán también del carácter hidrofóbico o hidrofílico de la superficie. Mediante la determinación del ángulo de contacto (θ) se puede estimar si un biomaterial es o no adecuado para su uso en biomedicina. Cuando un líquido contacta con un biomaterial puede ocurrir que la gota no moje la superficie del mismo, predominando las fuerzas de cohesión en el seno del líquido. Menzies y Lyndon describen valores de θ superiores a 90° para este tipo de superficies. Ésta ausencia de interacción dificultará los procesos biológicos de integración del biomaterial, indicando el carácter hidrofóbico del mismo. Sin embargo superficies hidrofílicas permitirán las interacciones con los tejidos biológicos, donde el líquido si mojará la superficie y cuyos valores de θ son inferiores a 90° . En el caso del quitosano el comportamiento celular vendrá determinado por el número de aminas primarias aportadas, es decir su DD (Bumgardner *et al.*, 2003a; Bumgardner *et al.*, 2007; Menzies y Lyndon, 2010; Lieder *et al.*, 2012).

Gracias a su gran moldeabilidad, el quitosano permite la obtención numerosos tipos diferentes de estructuras (filmes multicapa, liofilizados, esponjas, micro y nano partículas, nano fibras, etc) en combinación o no con otros polímeros y manteniendo sus buenas propiedades de citocompatibilidad (Busilacchi *et al.*, 2013). Así por ejemplo se han desarrollado filmes de quitosano y ácido poliláctico mejorando la adhesión, proliferación y actividad biosintética de osteoblastos humanos. "Scaffolds" de quitosano y PLGA también mostraron ser materiales idóneos para el crecimiento de osteoblastos. Nanofibras de PCL y quitosano permitieron la proliferación y diferenciación de las MCS (Muzzarelli *et al.*, 2012).

Es por lo tanto clave la exhaustiva caracterización del quitosano inicial, ya que sus parámetros fisicoquímicos serán determinantes sobre los procesos celulares en los cuales se verá involucrado el biomaterial pudiendo determinar el éxito del mismo.

4.4. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO* EN LA REGENERACIÓN ÓSEA

Los modelos *in vitro* son estudios que se realizan previamente a los ensayos *in vivo*, que aportan información muy valiosa permitiendo estudiar *in vitro* la respuesta del organismo a posibles tratamientos. Específicamente, permiten estudiar los mecanismos de respuesta a los fármacos administrados, así como caracterizar y optimizar diferentes materiales para su uso clínico. Además han permitido evaluar y estudiar los mecanismos de regulación implicados en el proceso de diferenciación celular ósea. De esta manera se han identificado una serie de marcadores que caracterizan la diferenciación celular a osteoblastos, como pueden ser la producción de ALP, de OC, síntesis de colágeno, y otros (Yamaguchi *et al.*, 2000).

No obstante los sistemas *in vitro* para testar nuevos biomateriales presentan limitaciones críticas a la hora de simular las condiciones *in vivo*. Cuando un biomaterial se implanta en el cuerpo humano es imprescindible tener en cuenta el contexto biológico complejo en el que se va a encontrar, tanto a escala celular como molecular. En ambos niveles el biomaterial contacta con distintos tipos celulares y diferentes biomoléculas presentes en el entorno biológico, que normalmente se encuentran ausentes en el estudio *in vitro*.

En función del tipo de interacción entre célula-biomaterial se producirán situaciones muy diferentes, desde rechazo del implante por interacción negativa o por el contrario, integración del mismo (interacción positiva) donde el implante consigue su finalidad, regenerar el tejido dañado. De ahí que los estudios biológicos *in vitro* desarrollados son incapaces de predecir con exactitud los procesos *in vivo*, particularmente en el contexto de la TE y la restauración de funciones.

Cuando un biomaterial muestra resultados satisfactorios en los test *in vitro* mediante cultivos celulares, la tendencia general en el campo de la investigación es la realización de experimentación *in vivo* para observar los efectos a nivel tisular. Como ejemplo en las fases iniciales de estudio de la formación de hueso ectópico *in vivo*, se suelen emplear modelos animales de pequeño tamaño (rata, ratón) más fáciles de manejar y de menor coste de mantenimiento. Generalmente se continúa con modelos de mayor tamaño, conejos, ovejas, cerdos, etc. En los últimos estadios de los estudios preclínicos se emplean animales cuyo tejido óseo sea más similar al humano en cuestión de metabolismo, fisiología y anatomía como por ejemplo la cabra o la oveja (Rengachary, 2002). Como inconvenientes, se plantean cirugías de mayor complejidad, así como también protocolos de anestésicos más complejos, tratamientos analgésicos post-cirugía y un coste de mantenimiento más elevado.

Para seleccionar el modelo animal adecuado, también se debe tener en cuenta el tamaño del defecto. Los defectos de tamaño crítico se emplean de forma frecuente en

investigación ya que no existe una curación espontánea del mismo. El tamaño del defecto crítico sigue siendo un tema muy discutido ya que depende de numerosos factores como la especie animal, el sexo o la localización de defecto (Rengachary, 2002).

Como se ha indicado anteriormente, las BMPs juegan un papel clave en la regeneración de las lesiones óseas. En los procesos de obtención de esta proteína a partir de hueso, se encontró que la cantidad de BMPs contenida en el hueso pulverizado era aproximadamente de 2 µg/kg. En una fractura sin embargo, se presumen mayores cantidades de proteína liberada presente, no sólo por la secreción celular sino también por una regulación positiva de la proteína liberada por citoquinas en el sitio de la lesión (Luginbuehl *et al.*, 2004).

Se desconoce la concentración exacta de la BMP-2 necesaria para favorecer la formación de hueso en la lesión, sin embargo dicha concentración depende de varios factores. En primer lugar hay que tener en cuenta la especie animal, ya que por ejemplo los defectos óseos en roedores se curan más rápido que en primates, por lo tanto estos últimos requieren dosis superiores de BMP-2 en el proceso de curación. En segundo lugar la edad de los mismos, dentro de la misma especie, sabiendo que organismos en fase de vejez requieren tiempos más prolongados para la curación del tejido óseo. Por último, el tipo y tamaño del defecto así como también su localización anatómica son factores importantes a tener en cuenta (Muzzarelli, 2009).

La aplicación de la rhBMP-2 en la curación de un defecto óseo produce la regeneración diferente a la que ocurre de forma natural. En ausencia de proteína, el hueso crece desde el borde del defecto hacia el centro, mientras que con proteína se recupera a través del defecto sin una dirección concreta. En humanos la curación oscila entre las 8 y las 10 semanas, bajo presencia de rhBMP-2, mientras que sin proteína se alarga la curación hasta 12-16 semanas.

La rhBMP-2 puede originar efectos en ambos sentidos según su concentración en el medio, es decir, a bajas dosis promueve y estimula la remodelación ósea pero altas concentraciones favorece la resorción y destrucción del tejido óseo. Incluso puede originar efectos secundarios si se excede en su dosis, como la formación de hueso ectópico (Liu *et al.*, 2010).

Uno de los principales inconvenientes para la aplicación clínica de la rhBMP-2 es el diseño de un transportador adecuado. Dicha proteína es hidrosoluble y difunde de forma rápida de los tejidos sin poder llegar a realizar su acción en la lesión. En estudios *in vivo*, se ha descrito que los efectos de la BMP-2 sin transportador no duran más de 2-3 horas en el lugar de depósito. De hecho en primates la semivida de la proteína es de 6,7 minutos debido a la degradación enzimática y a su rápido aclaramiento renal (Lo *et al.*, 2012).

Por esta razón, es de suma importancia escoger un transportador adecuado, que proteja al factor de ataques enzimáticos, localice su acción en el sitio del defecto de forma prolongada en el tiempo y controle su liberación en el medio. De esta manera la proteína consigue ser activa de forma adecuada disminuyendo los posibles efectos secundarios de su aplicación en biomedicina (Liu *et al.*, 2010).

4.5. TÉCNICAS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DE TEJIDO ÓSEO *IN VIVO*

Existen numerosas técnicas que nos permiten evaluar el tejido neoformado. Dentro de las técnicas convencionales las tinciones histológicas se emplean como técnicas de rutina en medicina. Estas técnicas se basan en el empleo de diferentes colorantes, con carácter ácido o básico, que reaccionan y colorean las estructuras de un tejido. Para ello, la histología precisa de cortes del tejido a estudiar, procedentes de la fijación del material tisular y su embebimiento en bloques de parafina.

Una tinción de uso frecuente en histología y clave en el campo de la biomedicina es la tinción de Hematoxilina Eosina (HE). Esta tinción se basa en la utilización de dos colorantes, hematoxilina y eosina, componentes acidófilo y basófilos respectivamente, que tiñen las estructuras tisulares acidófilas (como los núcleos celulares) de color morado y de color rosa a las estructuras basófilas (citoplasma) como se puede observar en la Figura 18.

Por otro lado, existen numeras tinciones específicas para distintos tejidos. En el caso del tejido óseo, una de las más empleadas es la tinción de Tricrómico de Masson donde, se colorea en verde luz (por acción del ácido fosfomolibdico) las diferentes estructuras características del tejido como las fibras de colágeno tipo I o las fibras reticulares.

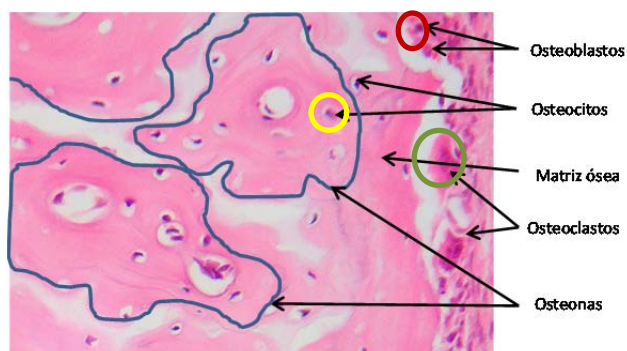


Figura 18. Microfotografía correspondiente a un corte histológico teñido con HE donde se aprecian los diferentes tipos celulares.

De forma complementaria, las técnicas de imagen médica son una excelente herramienta para el conocimiento de los procesos biológicos y el estudio de los efectos farmacológicos que se producen en un organismo. Son técnicas no invasivas muy atractivas en

el campo de la investigación y de la medicina. Aportan información directa empleando organismos vivos, con la adecuada resolución espacio temporal para el estudio los procesos celulares *in vivo*.

Se conocen numerosas técnicas de imagen que se dividen en dos grandes grupos, técnicas morfológicas (anatómicas) y moleculares (funcionales). Así en el primer grupo encontramos los Rayos X, la Tomografía Computarizada (CT, del inglés *Computerized Tomography*), la Resonancia Magnética y los Ultrasonidos, que se caracterizan por ser técnicas no invasivas y con una adecuada resolución espacial. En un segundo grupo se encuentran las técnicas de Tomografía de emisión de positrones (PET del inglés *Positron Emisión Tomography*) y Tomografía Computarizada de Emisión de un Fotón (SPECT del inglés *Single photon emission computed tomography*). Tanto PET como SPECT permiten la detección de cambios a nivel molecular y celular producidos por un proceso patológico, teniendo como contrapunto su baja resolución espacial, escasa información anatómica y elevado coste económico (Agrawal *et al.*, 2010).

La CT consigue crear imágenes 3D de un tejido mineralizado mediante el empleo de rayos X. La fuente emisora cambia de orientación aportando cortes o secciones del objeto desde múltiples ángulos que son captados por detectores y a través de algoritmos matemáticos, se obtiene la reconstrucción del sujeto de estudio. La suma de esos cortes conduce a la obtención de imágenes 2D y 3D aportando información sobre la estructura, tamaño, morfología, defectos internos y densidad del tejido. A través de los programas de tratamiento de imágenes de CT se puede calcular tanto el Volumen de Interés (VOI del inglés *Volume of Interest*) que coincide con el volumen del nuevo tejido óseo formado como la Intensidad de la señal (radiopacidad) de dicho tejido. Ambos parámetros aportan información muy valiosa sobre la calidad de hueso obtenido. Se trata de una técnica avanzada de rayos X cuya principal limitación radica en su bajo contraste en tejidos blandos, dificultando la detección de metástasis o tumores en los tejidos de estudio. Por estas razones es una técnica que se suele combinar con otras (Agrawal *et al.*, 2010; Odekerken *et al.*, 2013).

4.6. BIODISTRIBUCIÓN DE LA PROTEINA rhBMP-2

La relación dosis-respuesta es un paso clave para la evaluación del riesgo en la salud humana frente a la exposición a un determinado factor. Los modelos biocinéticos son una valiosa herramienta que relaciona los efectos debidos a la exposición de un factor con las dosis internas empleadas. Se trata de representaciones matemáticas de los diferentes procesos, absorción, distribución, metabolismo y excreción, que sufre un compuesto en el interior de un

organismo.

El conocimiento de las dosis administradas y los factores que influyen en los anteriores procesos, aportan la información necesaria sobre la dosis y su riesgo en la salud. La eliminación de la sustancia comprende procesos como su biotransformación o metabolización y su excreción del organismo. La disposición de un compuesto incluye tanto la eliminación como la distribución por el organismo, clasificándose los modelos en compartimentales y fisiológicos.

Para comprender y estudiar la biodistribución de un compuesto a través del organismo es necesario ser capaces de detectarlo de alguna forma en su interior. Una estrategia frecuentemente empleada es la realización de modificaciones en la estructura química del compuesto de interés, marcándolo bien mediante radioisótopos, bien con moléculas fluorescentes, asumiendo que dicha modificación no afecta ni a sus propiedades fisicoquímicas ni a su actividad.

El empleo de estos compuestos marcados facilita la detección del objeto del estudio de forma sencilla, dependiendo el método de detección y del tipo de marcaje empleado (autorradiografía, contaje por centelleo, lector de fluorescencia, imagen de fluorescencia, etc). De esta forma se obtiene información muy valiosa acerca de la localización de la sustancia marcada, de su metabolismo e incluso vías de eliminación (Morcillo *et al.*, 2002).

Las técnicas de marcaje fluorescente suelen emplear compuestos con aminas reactivas como el fluoruro de isotiocianato o NSH Fluoresceína. En el caso de marcaje radioactivo existe una amplia variedad de isótopos disponibles, cuyo tiempo de caída es muy variado, factor a tener en cuenta en el tipo de estudio a realizar (Véase la Tabla 4).

Los radioisótopos más utilizados en la actualidad para en el diagnóstico clínico son ^{99m}Tc , ^{131}I y ^{18}F . En menor medida se emplean también otros isótopos como ^{125}I , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{11}C , ^{13}N . Todos ellos, salvo el ^{131}I , son o bien emisores de positrones o de radiación gamma de períodos de semidesintegración relativamente cortos.

Existen una serie de condiciones que debe cumplir un trazador radiactivo adecuado. En primer lugar debe presentar propiedades fisicoquímicas que permitan su introducción al sistema, siguiendo fielmente su evolución y sin modificarlo, disponer de un período de desintegración apropiado para hacer el estudio y emitir radiaciones de tipo y energía adecuados determinando así el tipo de detector a emplear (Cohen y Furnari., 2012).

Tabla 4. Radioisótopos empleados en estudios biocinéticos.

Radionuclido	Semivida (t _{1/2})	Emisión máxima	Eficiencia de exposición
¹⁴ C	5370 años	156 keV	1
^{99m} Tc	6 horas	140 keV	2.3
¹²³ I	13 horas	159 keV	2.6
¹³¹ I	8 días	364 keV	2.9
¹²⁵ I	59,6 días	35 keV	0.74
¹⁸ F	1,8 horas	511 keV	3.1
⁶⁹ Ga	1,1 horas	511 keV	3.2

Esencialmente la producción industrial de isótopos de yodo radiactivo implica estos cuatro radionuclidos útiles ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I y ¹³¹I., tienen una vida media inferior a 60 días y se usan como trazadores y agentes terapéuticos en medicina. El ¹²⁵I emite radiación gamma, presenta una semi vida más larga que el resto y es menos energético. Se suele emplear como trazador de imágenes nucleares para evaluar la función anatómica y fisiológica del tiroides (Spetz *et al.*, 2013). Actualmente el radioisótopo ¹³¹I se emplean en el tratamiento contra el cáncer de tiroides tras una tiroctomía (Shahbazi-Gahrouei y Nikzad, 2011).

En primer lugar es fundamental conocer la propia distribución del yodo en el organismo para comprender mejor la distribución de los compuestos marcados con ¹²⁵I. El yodo es un componente esencial de las hormonas tiroideas (T4, tiroxina) y (T3, triyodotironina), ambas regulan procesos metabólicos y desempeñan importantes funciones en el crecimiento y el desarrollo. Existen numerosos sistemas compartimentales que describen el ciclo del yodo en el cuerpo humano. La Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP del inglés *International Commission on Radiological Protection*) empezó a utilizar dichos modelos y éstos han ido evolucionando con el tiempo hasta convertirse en modelos biocinéticos detallados con las dosis máximas absorbidas en función del sector (personal sanitario pacientes, etc) (Legget, 2010).

En la Figura 19 se representa a modo esquemático el proceso del yodo en el organismo y su distribución. La alimentación es la principal fuente de yodo, bajo la forma de yoduro potásico y se absorbe en el intestino delgado. Este yoduro se distribuye de forma rápida por los fluidos extracelulares alcanzando en una hora el equilibrio.

El yoduro en sangre se concentra en las glándulas salivares y la pared estomacal mediante transporte activo. La concentración de yodo en esas secreciones como saliva o jugo gástrico es de 20 a 40 veces la concentración plasmática (Leggett, 2010).

El tiroides y el riñón compiten por el yoduro en sangre. Normalmente más de un 90% del yodo eliminado del organismo se debe al aclaramiento renal de yoduro. Una parte del yodo inorgánico se elimina vía heces. La excreción fecal procede en su mayoría de las secreciones biliares, debido al metabolismo de la T4, ya que se inactiva en el hígado. El yoduro en plasma es filtrado por el riñón y el 70% del yodo filtrado es reabsorbido y el 30% restante alcanza la vejiga urinaria y es excretado en orina (Leggett, 2010).

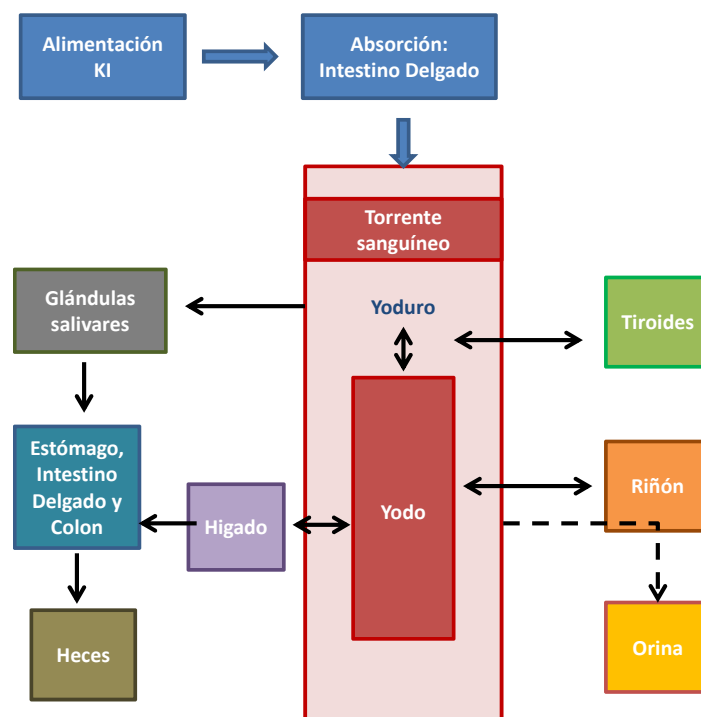


Figura 19. Estudio compartimental del yodo propuesto por R. W. Leggett (2010). Desde la absorción a través de la dieta hasta la eliminación del organismo vía orina y heces principalmente.

El uso de radioisótopos es por lo tanto uno de los métodos más frecuentes para realizar estudios biocinéticos de una sustancia. En función de las características de los estudios biocinéticos a realizar, se debe seleccionar de forma adecuada el radioisótopo a emplear. La semivida, o el tipo de radiación que emiten son factores limitantes a la hora de emplear dichos marcadores. El método de detección varía en función de la radiación emitida por el radioisótopo. Si se dispone de un emisor de radiación beta o gamma, se podría emplear un contador de centelleo líquido o sólido. En cambio sí es un emisor alfa, debería ser un centelleo líquido o por espectrometría alfa ya que su poder penetrante es inferior.

En 1954 Ullberg desarrolló la macroautorradiografía de cuerpo entero (MARG) en el estudio de la distribución y metabolismo de ^{35}S -benzilpenicilina en ratones (Ullberg, 1954). Esta técnica permite visualizar de forma bidimensional la distribución de un compuesto marcado con un radioisótopo. Permite localizar la presencia del radioisótopo en pequeñas estructuras o en regiones localizadas de un órgano. La actividad que se suele emplear en la MARG varía entre los 3-4 Bq/kg de peso corporal para moléculas cargadas con ^{125}I o ^{14}C (Morcillo *et al.*, 2002).

La radiación que emite el radioisótopo retenido en los cortes produce la reducción de los iones plata en átomos de plata de las placas de fotografía obteniéndose así una imagen que se hace visible mediante el proceso de revelado. La imagen resultante muestra, en escala de grises, la presencia o acumulación del radioisótopo en dicha zona corporal, como se puede apreciar en la Figura 20.

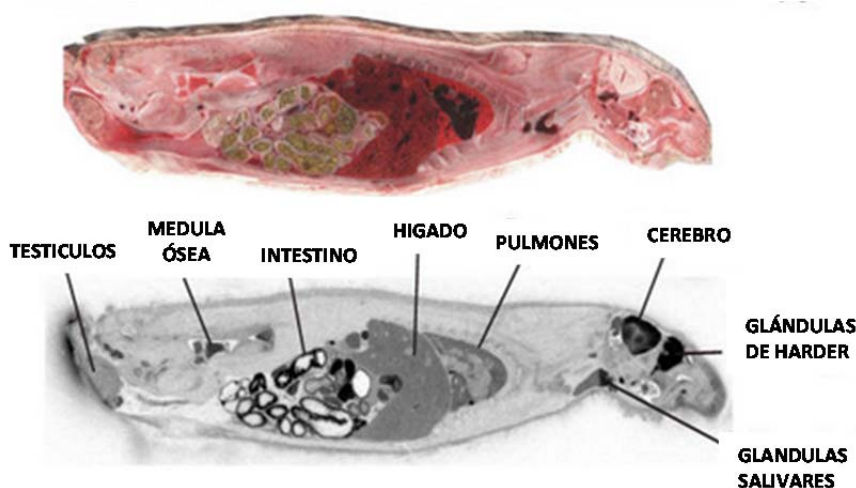


Figura 20. Fotografía de un corte liofilizado de una rata entera y su autorradiografía. Las zonas de mayor acumulación del compuesto marcado aparecen en negro. La intensidad de color está relacionada con la cantidad presente del compuesto en el órgano. En este ejemplo, el compuesto marcado se acumula sobre todo en cerebro, glándulas de Harder y glándulas salivares (Morcillo *et al.*, 2002).

En la actualidad se ha desarrollado una técnica más evolucionada denominada autorradioluminografía del animal completo (Gunther *et al.*, 2000) que, en lugar de emplear películas radiográficas utiliza pantallas con fósforo que contienen cristales de fluorobromuro de bario activado con europio (Ba FBr-Eu^{2+}). Estos cristales almacenan la radiación liberada de los cortes del animal y esa energía se transforma en luminiscencia al incidir sobre las placas un láser (Morcillo *et al.*, 2002). Esta luminiscencia es detectada generando una imagen cuantitativa que representa la distribución de la radiactividad en las secciones o cortes de

estudio. Este método permite obtener de forma automática imágenes digitalizadas y cuantificar en un rango más amplio, empleando un menor tiempo de exposición y con la incorporación de patrones internos.

La presencia de radiactividad en un órgano o tejido puede ser debida al depósito de la sustancia marcada con el radioisótopo o al de sus metabolitos. Para discernir qué porcentaje de radiactividad se debe a uno u otro, molécula o metabolito, se han de emplear técnicas auxiliares, como por ejemplo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC del inglés *High Performance Liquid Chromatography*).

II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El Grupo de Ingeniería de Tejidos y Regeneración Ósea de la Universidad Complutense de Madrid UCM, a cargo del Doctor Jose Luis López Lacomba, lleva trabajando desde el año 1996 en el desarrollo de nuevos materiales para su aplicación en la regeneración de tejido óseo.

Los trabajos anteriormente realizados en el grupo permitieron desarrollar un protocolo optimizado para obtener diferentes tipos de proteínas activas (rhBMP-2, rhBMP-4, rhBMP-7) y desarrollar un biomaterial en forma de película con elevada adherencia celular y que retenía dichos factores (Patente Internacional PCT/ES01/00322).

Paralelamente se han realizado estudios en el laboratorio empleando otros materiales como cerámicas de β -TCP e hidroxiapatita, discos de titanio con diferentes tratamientos superficiales, andamiajes de policaprolactona e incluso de nanotubos de carbón. El presente trabajo doctoral sigue la línea de investigación de los materiales derivados de la quitina y el quitosano.

Como consecuencia de las diferentes líneas de investigación iniciadas, se están obteniendo numerosos resultados materializados en contribuciones a congresos, artículos científicos, proyectos de investigación y colaboraciones con diferentes grupos y empresas. Los desarrollos realizados han permitido la creación de una Empresa de Base Tecnológica "Noricum S.L." cuyo fin último es la comercialización, tras realizar las correspondientes pruebas clínicas y recibir la autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, de implantes dentales recubiertos con estos filmes activados para la oseointegración de los mismos.

El objetivo de esta Tesis Doctoral se ha centrado en la caracterización de los parámetros fisicoquímicos del quitosano, con objeto de diseñar filmes del mismo, de forma que permitan modular y predecir la liberación del factor bioactivo rhBMP-2 y sus efectos en el sitio de acción. El fin último de esta tesis doctoral es conseguir una mejora en la reparación del defecto óseo.

El objetivo general se encuentra dividido en los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar diferentes tipos de quitosanos y sus filmes, determinando los principales parámetros que van a influir en su aplicación final.
2. Estudiar la biocompatibilidad *in vitro* de los filmes de quitosano centrándonos en los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación celular.
3. Estudiar la liberación de la proteína rhBMP-2 desde los filmes de quitosano donde se encuentra inmovilizada.
4. Evaluar la liberación de la proteína rhBMP-2 y la degradación de su transportador en sistemas *in vivo*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

Los quitosanos fueron adquiridos a la empresa Biolog (Alemania) un total de 10 muestras (Q1 al Q10) y otros dos, Q11 y Q12, a la empresa Primex (Noruega). La rhBMP-2 fue donada por la empresa Noricum S.L. La rhBMP-2 ⁻¹²⁵I se compró a Perkin Elmer. El resto de reactivos se compraron la casa comercial Sigma S.L.

2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL QUITOSANO

2.1. DESCRIPCIÓN VISUAL

Se determinó de forma visual la coloración y la morfología inicial sobre un fondo blanco.

2.2. TAMAÑO DE PARTÍCULAS

Las muestras de quitosano se molieron empleando un molino (Fritsch Pulverisette 14) con separador ciclón y con un tamiz de malla (0,2mm).

2.3. CONTENIDO EN HUMEDAD

Se determinó el porcentaje de agua presente en las muestras mediante gravimetría, secando una muestra (0,3 g) en estufa de vacío (Selecta, VACIOTEM) a 105°C y 0,8 bares de presión hasta peso constante. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\text{Humedad \%} = (P3 \times 100) / P1$$

Siendo:

P1: peso inicial de la muestra.

P2: peso de la muestra seca.

P3: peso del agua contenida inicialmente en la muestra (P1-P2).

2.4. CONTENIDO EN CENIZAS

La cantidad total de materia inorgánica presente en las muestras se determinó por gravimetría, llegando hasta la obtención de cenizas blancas o ligeramente grises tras la

calcinación de 0,5 g de muestra a 800°C en una mufla (NEY, Vulcan A-130). Las determinaciones se realizaron por triplicado y el porcentaje de cenizas se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Cenizas \%} = (P2 \times 100) / P1$$

Siendo:

P1: peso de la muestra seca (teniendo en cuenta el contenido de agua).

P2: peso de cenizas obtenidas

2.5. CONTENIDO DE INSOLUBLES

Se determinó por gravimetría el contenido de material insoluble presente en el quitosano empleando soluciones al 1% (p/v) en ácido acético 1% (v/v). Tras 24h de agitación, se centrifugó y se filtró a vacío dicha solución por un filtro de 0,45 µm. El filtro se desecó en estufa a 37°C hasta peso constante (Weinhold *et al.*, 2009).

$$\text{Insolubles \%} = (P2 \times 100) / P1$$

Siendo:

P1: peso de la muestra seca.

P2: peso de material insoluble presente en el filtro.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.6. CONTENIDO DE METALES PESADOS

El ensayo se realizó empleando un espectrómetro de emisión excitación ICP (ICP-OES, CAI Centro de espectrometría atómica de la UCM). En el análisis se determinó el contenido en plomo y mercurio por triplicado de las cenizas de los quitosanos resuspendidas en HCl 5% (v/v) y filtradas por 0,22 µm, siguiendo el método descrito por Mahmoud y colaboradores (Mahmoud *et al.*, 2007).

2.7. ANÁLISIS ELEMENTAL

Se determinaron los contenidos en peso de nitrógeno y carbono de las muestras por macroanálisis elemental (LECO CNS-2000I, CAI de Microanálisis Elemental, Facultad de Farmacia, UCM). Se llevaron 0,3 g de muestra a combustión a una temperatura de 1200°C,

usando aire como blanco.

2.8. PESO MOLECULAR (Mw)

El peso molecular promedio viscoso (\overline{M}_v) se determinó en función de la $[\eta]$. Este parámetro se obtiene partir de medidas de viscosidades relativas de soluciones con diferentes concentraciones de polímero, previamente filtradas por 0,22 μm , preparadas en el solvente 0,3 M de ACH/ 0,2 M de ACONa. Las medidas se realizaron en un viscosímetro capilar, tipo Ubbelohde acoplado a un equipo de medición ViscoClok (Schott-Gerate, Germany) en un baño de agua termostatzado a temperatura constante (25°C) con un capilar modelo N° 525.20 / II de 1,03 mm de diámetro (Wang *et al.*, 1991).

La viscosidad intrínseca ($[\eta]$) está relacionada con el peso molecular a través de la ecuación de Mark- Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS):

$$[\eta] = K \cdot \overline{M}_v^a$$

donde K y a son dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, del sistema de disolventes utilizados y de la temperatura, siendo los valores $a=0,76$ y $K= 0,69 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$ para el solvente Rinaudo a 25°C (Roberts y Domszy, 1982). Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

2.9. GRADO DE DESACETILACIÓN (DD)

Se evaluó mediante espectroscopía ^1H -RMN siguiendo el método descrito por Hirai y colaboradores (Hirai *et al.*, 1991), teniendo en cuenta la intensidad de la integral de los protones del grupo $-\text{CH}_3$ (I CH_3 , tomado como referencia) y la suma de las intensidades de las integrales de los protones $\text{H}_2\text{-H}_6$ (I $\text{H}_2\text{-H}_6$) empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Grado de desacetilación (\%)} = \left[1 - \left(\frac{1}{3} I_{\text{CH}_3} / \frac{1}{6} I_{\text{H}_2 - \text{H}_6} \right) \right] \times 100$$

Las medidas se llevaron a cabo a 70°C en un equipo AMX500 Bruker, con un campo magnético estático de 500,13 MHz (CAI de Resonancia Magnética, UCM). Para la determinación del grado de desacetilación se emplearon 10 mg de muestra en 0,5 mL de una solución DCl/D₂O (2% p/p) introducidos en tubos de rmn de 5 mm de diámetro. Las

determinaciones se realizaron por triplicado, mostrándose un ejemplo del espectro en la Figura 21.

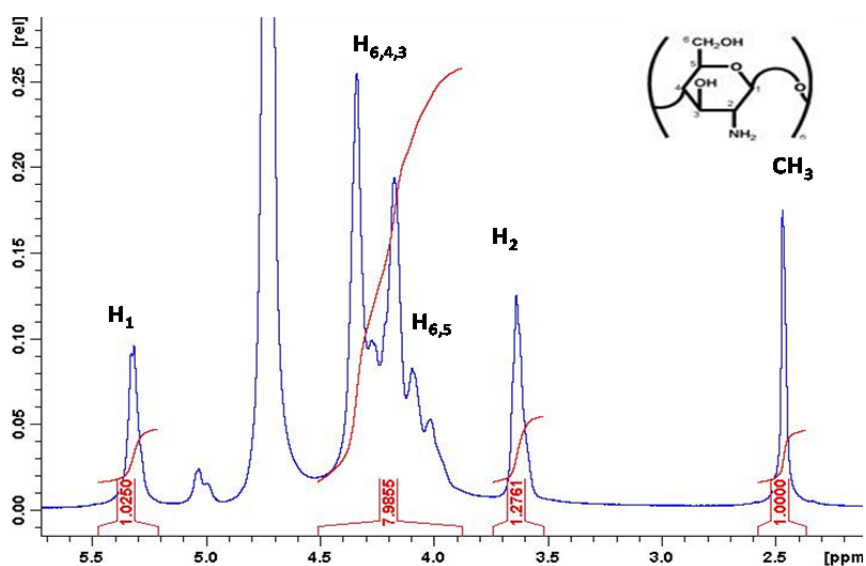


Figura 21. Ejemplo del espectro de un quitosano empleado para la determinación del DD.

2.10. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Se empleó un difractor automático PHILIPS X'PERT MPD (CAI de DRX, Facultad de Farmacia, UCM). El equipo posee un goniómetro PW3050 (θ - 2θ) y la potencia del generador se fijó a 45kV y 40mA. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente con radiación $\text{CuK}\alpha^1$ (de longitud de onda $1,54056\text{\AA}$) con monocromador de grafito y en geometría confocalizada (Bragg-Berntano). Se fijó el tamaño y la duración de paso (2θ) de las medidas en $0,040^\circ$ y en 1 segundo. El rango angular estudiado fue de 5° - 40° (2θ).

El IC del quitosano se determinó según el método propuesto por Segal (1959) para la celulosa y adaptado al quitosano mediante la ecuación:

$$\text{Indice de Cristalinidad (\%)} = \left(\frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \right) \times 100$$

donde I_{110} es la intensidad máxima de la reflexión a $2\theta = 20^\circ$ y la I_{am} es la intensidad mínima de la difracción en la región amorfa a $2\theta = 16^\circ$ aproximadamente. Las determinaciones se realizaron por triplicado mostrándose un difractograma en la Figura 22.

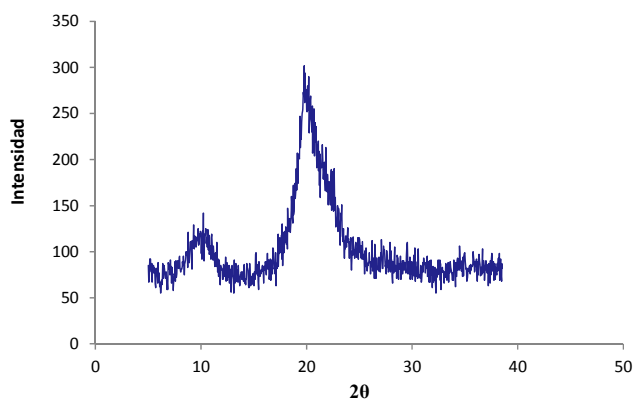


Figura 22. Ejemplo del difractograma de rayos X de un quitosano. Se observan los picos 2θ característicos alrededor de $9,4$ y 20° .

2.11. VISCOSIDAD ROTACIONAL

Se determinó la viscosidad rotacional de soluciones de quitosano en ácido acético al 1% (v/v) a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ empleando un equipo Brookfield Digital Viscosimeter modelo DV-II +pro (Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC). Las medidas se realizaron por triplicado, empleando una velocidad de fricción constante (200 rpm).

2.12. VISCOSIDAD INTRÍNSECA

Se determinó la viscosidad intrínseca mediante la determinación de las viscosidades cinemáticas de las diluciones de una solución madre de quitosano (0,05% p/v) en ácido acético 50 mM. Tras 24 horas de agitación y filtrada dicha solución previamente por $0,22 \mu\text{m}$, se empleó un microviscosímetro capilar (Automated Micro Viscometer: Anton-Paar. Capilar: nº serie 15942128; \varnothing 1,6 mm) a temperatura constante ($25 \pm 0,1^\circ\text{C}$). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS FILMES DE QUITOSANO

3.1 PREPARACIÓN DE FILMES DE QUITOSANO

Se prepararon soluciones de quitosano en ácido acético 50 mM teniendo en cuenta su contenido de humedad, cenizas y porcentaje de insolubles. Tras 24 horas de agitación a temperatura ambiente, se filtraron por $0,22 \mu\text{m}$ en esterilidad. Los filmes se prepararon a partir de estas soluciones tomando alícuotas de $200 \mu\text{L}$ en superficies de 1 cm^2 . Se dejaron en cámara de flujo laminar, durante toda la noche hasta la completa evaporación del solvente. Para la estabilización de los filmes se añadieron $400 \mu\text{L}$ del tampón fosfato 0,25 M (pH 7,4) y

posteriormente se realizaron tres lavados con PBS.

3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Se obtuvieron los espectros infrarrojos de filmes de los quitosanos empleando un equipo Perkin Elmer Spectrum One acoplado a un equipo de Reflectancia Total Atenuada (ATR del inglés *Attenuated Total Reflectance*) en el ICTP (CSIC). Los scans se realizaron desde 400 a 4000 cm^{-1} de longitud de onda con una resolución de 4 cm^{-1} . En la siguiente figura se presenta las bandas características de los espectros infrarrojos de quitina y quitosano (Figura 23).

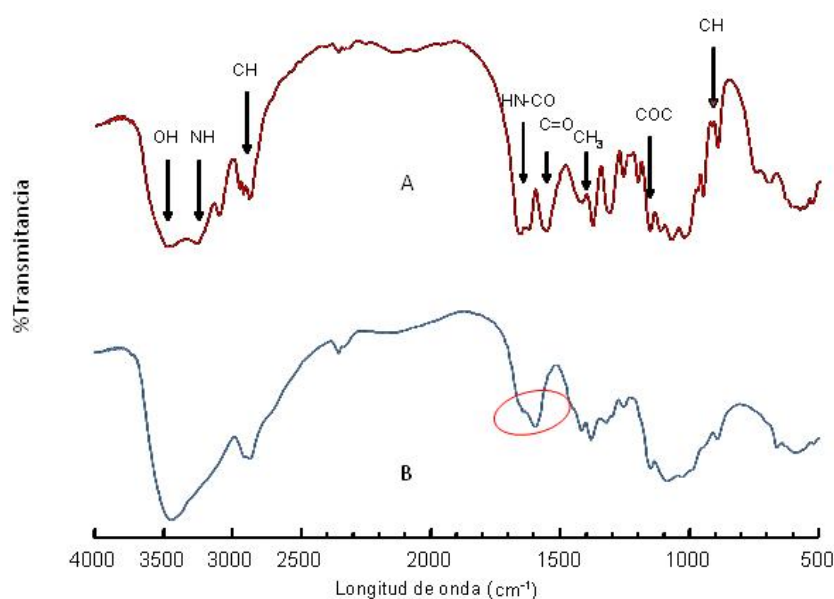


Figura 23. Espectro de TF-IR de quitina (A) y de quitosano (B). Se señalan las bandas características de cada grupo químico y la localización de las principales diferencias entre ambos polímeros.

3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Para el estudio de la superficie de los filmes de quitosano las muestras se metalizaron con oro en un evaporador a vacío (Balzers SDC 004 Sputter coater, likon Corporate Pfäffikon, Switzerland) con un vacío de 0,1 mbar y a 25 mA, durante 3 minutos. Posteriormente se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6335 CF empleando un voltaje de aceleración de electrones de 5kV para visualizar la superficie de los filme (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Facultad de químicas, UCM).

3.4 DETERMINACIÓN DE LA RUGOSIDAD

La rugosidad superficial (S_a) de los filmes se determinó por microscopía interferométrica (MI) empleando para ello un microscopio interferométrico (MicroXAM™ Optical Profiler, Noricum, S.L.). La adquisición, análisis y visualización de los datos metrológicos de la superficie se realizó usando el programa SPIP™ (Scanning Probe Image Processor). Se realizaron 3 determinaciones en cada filme y éstos por triplicado.

3.5 DETERMINACIÓN DEL ESPESOR

Con la ayuda de un bisturí se desprendió parte de un filme previamente formado sobre un disco de vidrio de 1 cm^2 . Posteriormente, se determinó el espesor de los filmes midiendo el perfil de corte empleando un microscopio interferométrico (MicroXAM™ Optical Profiler, Noricum, S.L.). Los datos se obtuvieron mediante el análisis de las imágenes con el programa SPIP™. Se realizaron 3 determinaciones en cada filme y éstos por triplicado.

3.6 DETERMINACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO

Se determinó el ángulo de contacto formado por una gota de $5\ \mu\text{l}$ de agua destilada depositada sobre la superficie de filmes de quitosano (FTA1000 Drop Shape Analysis System First Ten Angstroms, Departamento Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de químicas, UCM). Se realizaron 2 determinaciones en cada filme y éstos por triplicado.

3.7 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HINCHAMIENTO

Los filmes de quitosano se realizaron sobre discos de plástico según el protocolo descrito en el punto 3.1. Se cortaron en trozos de $0,5\text{ cm}^2$ de superficie y se determinó el peso inicial en estado seco. A continuación cada pieza se sumergió durante diferentes tiempos en tampón fosfato, PBS (pH 7,4) o en acético acetato (pH 5,4). Transcurrido el tiempo, las piezas se centrifugaron (un golpe de centrifuga) y finalmente se procedió a la pesada de los filmes.

El porcentaje de hinchamiento se determinó midiendo la diferencia de peso entre el filme en estado hidratado y seco mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = (P1 - P2) / P2 \times 100$$

P1 = peso húmedo de la muestra

P2 = peso seco de la muestra

4 ENSAYOS DE LA DEGRADACIÓN DE QUITOSANO

4.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE QUITOSANO

Se partió de disoluciones de quitosanos al 1% (p/v) en ácido acético 50 mM, teniendo en cuenta su contenido de humedad, cenizas y porcentaje de insolubles. Se disolvieron en 100 mL de ácido acético 50 mM y se dejaron en agitación 24 horas.

4.2 DEGRADACIÓN ÁCIDA DE LA SOLUCIÓN DE QUITOSANO

Se adicionaron 800 μ L de la solución de quitosano a 20 mL de tampón acético-acetato de sodio 0,1 M (pH 5,4) en botes de vidrio de 23 mm de diámetro x 58 mm de alto. Se incubó a 37 °C con agitación continua a 55 rpm (Lab Therm, Kuner). A diferentes tiempos de incubación, se retiró la solución de quitosano, se enrasó en matraz aforado de 25 mL, se filtró por 0,22 μ m y se determinó su viscosidad empleando un microviscosímetro capilar. (Automated Micro Viscometer: Anton-Paar, Capilar: nº serie 15942128; \varnothing 1,6 mm, Noricum, S.L.).

4.3 DEGRADACIÓN DE LOS FILMES DE QUITOSANO

Se prepararon filmes de quitosano para cada punto temporal siguiendo el procedimiento experimental detallado en el apartado 3.1 empleando 800 μ l de la solución de quitosano. Los filmes se pusieron en contacto con 20 mL de una solución tampón acético-acetato de sodio 0,1 M (pH 5,4), se dejaron incubando a 37°C con agitación continua a 55 rpm (Lab Therm, Kuner). El sobrenadante se retiró a determinados periodos de tiempo y se enrasó en un matraz aforado de 25 mL. Se filtró esta solución por 0,22 μ m y se determinó la viscosidad (Automated Micro Viscometer: Anton-Paar. Capilar: nº serie 15942128; \varnothing 1,6 mm).

Tras el ensayo de degradación se adicionaron a los botes 20 mL de ácido acético 50 mM y se dejaron a 37°C durante 24h, con agitación continua (55 rpm) hasta disolución total. Se enrasó en matraz aforado de 25 mL, se filtró por 0,22 μ m y se determinó su viscosidad.

4.4 DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA SOLUCIÓN Y DE LOS FILMES

Para el desarrollo de los estudios de degradación enzimática se emplearon dos enzimas, quitosanasas (EC 3.2.1.132, *Streptomyces griseus*, Sigma) y Lisozima (EC 3.2.1.17, chicken egg White, Sigma). Las enzimas se disolvieron en tampón acético-acetato de sodio 0,1M (pH 5,4) a una concentración de quitosanasas 0,0345 µg/mL y de lisozima 2,5 µg/mL. Se adicionaron 20 mL de la solución de enzima tanto para filmes (realizados según lo descrito en el apartado 4.3) como para la solución de quitosano (detallada en el apartado 4.1).

5 ENSAYOS *IN VITRO*

5.1 PREPARACIÓN DE FILMES DE QUITOSANO

Los filmes con y sin proteína se realizaron siguiendo el proceso anteriormente descrito en el apartado de materiales y métodos 3.1, sobre placas de 48 pocillos (Corning Costar), en ambiente de esterilidad. La proteína rhBMP-2 fue obtenida, purificada y plegada hasta su conformación activa por la empresa Noricum, S.L.

5.2 LÍNEA CELULAR C2C12

Se trata de una línea celular adherente premitótica de músculo de ratón, adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1772-Manassas, Virginia). Son células de diferenciación rápida originando miotúbulos contráctiles y proteínas características de músculo. Sin embargo es una línea celular ampliamente utilizada ya que en presencia de rhBMP-2, las células se diferencian hacia linaje osteoblástico. El mantenimiento de los cultivos se realizó en frasco de 25 cm² de superficie con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alto en glucosa que previamente fue enriquecido con suero fetal bovino 10% y antibiótico penicilina /estreptomomicina (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomomicina).

La propagación celular se realizó en condiciones estériles cada 4 días, hasta alcanzar una confluencia celular del 80-90% de confluencia. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS, se utilizó tripsina para despegar las células de la superficie de cultivo. Para inactivar la tripsina, se añadió medio DMEM completo y se determinó el número de células obtenidas mediante cámara de Neubauer. En cada propagación, la concentración inicial de células fue de 2500 -3000 células por cm² de superficie de cultivo.

5.3 ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

Los ensayos celulares se llevaron a cabo en ambiente de esterilidad, por triplicado, empleando células de pase inferior a 15, en placas de 48 pocillos donde se han realizado previamente los filmes de quitosano. La densidad celular empleada fue de 5.000 células/cm² para los ensayos de adhesión y 10.000 células/cm² para estudiar la proliferación y diferenciación celular. Las superficies controle fueron plástico tratado para la adherencia celular y filmes con medio sin células. La siembra de células sobre los filmes se realizó por triplicado, previa tripsinización del pase celular y conteo en cámara Neubauer. Las placas sembradas se incubaron en estufa de CO₂ (Jouan), a 37°C, con una humedad relativa del 90% y 5% de CO₂.

5.3.1 Contenido total de proteínas (Ensayo de Bradford)

El contenido total de proteínas en cada ensayo se determinó por el método MicroBradford (BioRad). Este ensayo se basa en la afinidad del colorante azul de Coomassie G250 por las proteínas y se utiliza para cuantificar la proliferación celular a través de la determinación de la absorbancia a 590 nm. Para ello se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados de PBS de 200 µl eliminando así las proteínas del medio y se añadieron 100 µL de buffer de lisis a cada pocillo (Tris pH 6,8 50 mM, Tritón X-1000 1%, MgCl₂ 2 mM). Tras realizar 3 ciclos de congelación-descongelación para conseguir la ruptura de la membrana celular y la consiguiente liberación del contenido citoplasmático al medio, se separaron 10 µL del lisado celular, por triplicado, y se adicionaron 60 µL de reactivo Bradford y 230 µL de agua destilada. Se incubó durante 15 minutos y se determinó la Absorbancia a 590 nm empleando un lector de placas (Biotek FL-600). Para cuantificar la cantidad de proteína de las muestras se realizó una recta patrón con cantidades conocidas de proteína Ig G (Figura 24).

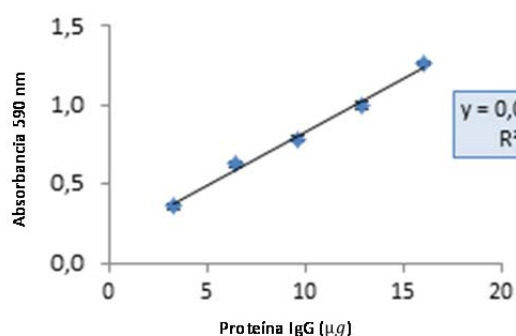


Figura 24. Ejemplo representativo de la curva de calibrado del método de Bradford.

5.3.2 Determinación de la actividad metabólica I (Ensayo de MTS)

El ensayo de MTS (sal de tetrazolio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxipenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]) consiste en una reacción colorimétrica producida al añadir esta sal de tetrazolio al medio de cultivo. En presencia de la succinato deshidrogenasa (enzima mitocondrial presente exclusivamente en células vivas) se produce la ruptura de la sal dando como resultado cristales de formazán de un color oscuro, solubles en el medio de cultivo. Se determinó la absorbancia a 460 nm de la solución obtenida la cual, en principio, es directamente proporcional a la actividad mitocondrial y por lo tanto a la proliferación celular.

Se añadieron 80 μ l del reactivo de MTS (CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Promega) directamente al medio de cultivo, se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ y se realizó la lectura de la absorbancia.

5.3.3 Determinación de la actividad metabólica II (Ensayo de Alamarblue)

El principal compuesto del Alamarblue es Resazurina, componente no fluorescente y de color azul, que en presencia de células (metabólicamente activas) es reducido a Resorufina (compuesto fluorescente de color rosa). La señal de fluorescencia obtenida por la reducción de resazurina es directamente proporcional a la cantidad de células presentes.

Se añadieron 40 μ l del reactivo Alamarblue (Alamarblue[®] Cell Viability Reagent Invitrogen) directamente al medio de cultivo (10 μ l por cada 100 μ l de medio celular), se incubó a 37°C, durante 1 hora 30 minutos en oscuridad y se realiza la lectura de fluorescencia (longitud de onda de excitación 570 nm y de emisión 590 nm).

5.3.4 Determinación de la actividad ALP (Ensayo de diferenciación)

La enzima fosfatasa alcalina es un indicador temprano de la diferenciación ósea. La actividad de esta enzima se determinó y cuantificó de manera colorimétrica, empleando un sustrato que, tras la acción de la enzima, da lugar a un producto de intenso color amarillo. Para la realización del ensayo, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con PBS para eliminar los posibles restos de proteínas del suero fetal bovino.

Se añadieron 100 μ L de buffer de lisis a cada pocillo (Tris pH 6,8 50 mM, Tritón X-1000 1%, MgCl₂ 2 mM) y se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación. Se separaron 10 μ L del lisado celular, por triplicado, y se le añadieron 100 μ L de buffer sustrato (50 μ L de p-nitrofenilfosfato y 50 μ L de buffer 2-amino-2-metil-1-propanol). Tras 15 minutos de incubación

a 37°C, la reacción se paró con 100 µL de NaOH 0,5 M y se midió la Absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Biotek FL-600).

5.3.5 Tinción del citoesqueleto celular (inmunocitoquímica directa)

Tras el cultivo celular los filmes sembrados fueron fijados con Paraformaldehído 4% durante 10 minutos. Tras varios lavados con PBS, se añadió Tritón X-100 al 0,1% en PBS (3 minutos en oscuridad), se lavó de nuevo con PBS y se añadió el reactivo de Actina, siguiendo el protocolo comercial (Texas Red^R -X-Phalloidin, Molecular Probes). Trascorridos 20 minutos de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se retiró el reactivo de actina, se realizaron dos lavados consecutivos con tampón PBS y se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Olympus IX51 microscope, filtro TRICT).

Se empleó como tinción de contraste el reactivo de Hoescht (tinción del DNA, Molecular Probes) añadiendo 5 µl junto con el reactivo de actina en PBS.

5.4 LIBERACIÓN *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA rhBMP-2 DESDE FILMES

Los filmes de quitosano con y sin proteína rhBMP-2 se prepararon en placas de 48 pocillos, siguiendo el método descrito en el punto 3.1. Se pusieron 400 µl de medio de cultivo DMEM completo y se dejaron incubando a 37°C y en agitación a 55 rpm (Lab Therm, Kuner). Los medios de liberación se recogieron a diferentes tiempos de incubación y fueron almacenados a 4°C. Una vez finalizada la recogida de los medios se procedió a colocarlos en una nueva placa de 48 pocillos y en ellos se realizó la correspondiente siembra de células C2C12 a una densidad de 10.000 células/pocillo.

Por otra parte la placa donde se encontraban los filmes (ya empleados en el ensayo de liberación) también se sembró, empleando el mismo pase celular y bajo las mismas condiciones experimentales, a 10.000 células/cm² para determinar la cantidad de proteína retenida en el filme (no liberada). Tras 4 días de incubación en estufa de CO₂ se retiró el medio de cultivo de ambas placas y se determinó la cantidad de proteínas totales y la actividad ALP.

6 ESTUDIOS *IN VIVO*

6.1 PREPARACIÓN DE FILMES DE QUITOSANO

Los filmes de quitosano se prepararon siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 3.1, sobre placas de plástico de 35 mm de diámetro adaptando el protocolo a este tamaño de superficie.

Para los ensayos de degradación *in vivo* se insertaron dichos filmes en bastidores autoclavados de Polioximetileno-C obteniendo 3 filmes por placa (Figura 25). Los anillos están formados por dos arandelas que al encajar atrapan el filme de quitosano dejando al descubierto una superficie de contacto de 0,2 cm² de filme.

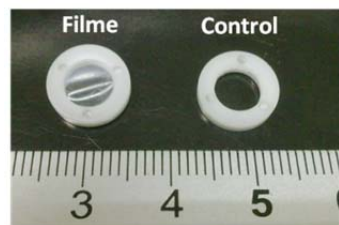


Figura 25. A Imagen de un filme de quitosano inserto en un bastidor y a su derecha un bastidor control sin filme.

6.2 CIRUGÍA EXPERIMENTAL

El estudio *in vivo* de la degradación de los filmes de quitosano fue realizado en el animalario de la Facultad de Medicina (UCM), donde los animales se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada con ciclos alternos de 12 horas de luz-oscuridad y se les proporcionó comida y agua *ad libitum* durante todo el período de estudio.

Para la realización de los ensayos *in vivo* de degradación del filme y liberación de la proteína se emplearon ratas macho de raza Wistar de 300 g de peso, y fueron anestesiadas con Isoflurano^R (2% en 30% O₂). Se procedió a la implantación de las muestras por medio de una incisión longitudinal de aproximadamente 4 cm de longitud siguiendo la columna vertebral, a 3 cm de la raíz de la cola. Despegando y desplazando dicho tejido a ambos lados de la columna se localizó el tejido muscular donde se realizó la inserción del anillo. Por cada animal de experimentación se introdujeron 2 muestras, en sendos sacos intramusculares a ambos lados de la columna vertebral.

El sacrificio se realizó mediante inyección de Pentobarbital (300 µl en la vena de la cola) y se recuperó el tejido muscular donde se insertó la muestra. Dichas muestras fueron

fijadas en PFA al 4% para su posterior tratamiento histológico en parafina.

En el caso de los ensayos de liberación de la rhBMP-2 *in vivo* se insertaron los filmes sin bastidor pero con una pequeña pieza de POM-C como marcador.

6.3 TRATAMIENTO HISTOLÓGICO

Las muestras se fijaron en PFA 4% durante 3-4 días. A continuación se sometieron a un proceso de deshidratación mediante una serie de soluciones etanólicas de concentración creciente (70%, 80% 90%, 95% y 100%, 1 hora en cada uno). Tras dos pasos de xileno (2 horas cada uno) y dos de parafina (2 horas cada paso) se prepararon los correspondientes bloques. Se obtuvieron cortes de aproximadamente 4-5 μm de espesor empleando un microtomo (Leica RM 2155). Los mismos se desparafinaron (en estufa con xilol durante 10 minutos), se hidrataron utilizando una serie etanólica de concentración decrecientes (absoluto, 95%, 80% y 70% dejando la muestra durante 1 minuto en cada solución) y se realizaron diferentes tinciones. Para analizar los cortes histológicos se obtuvieron imágenes de los mismos empleando un microscopio Olympus BX51.

6.3.1 Tinción de Hematoxilina/Eosina (H/E)

Tras la hidratación de los cortes se lavó con agua destilada durante 5 minutos y se dejó en Hematoxilina de Harris (HHS16 Sigma®) durante 10 minutos. Tras un segundo lavado con agua destilada se añadió Eosina (Sigma®) durante 1 minuto y 30 segundos y se puso de nuevo etanol al 96% y etanol absoluto durante 5 minutos. Por último se realizó el montaje de la muestra empleando una gota de Mounting Media (C9368 Sigma®) encima del porta y colocando un cubre. Se dejaron secar hasta el día siguiente.

6.3.2 Tinción de Tricrómico de Massons (TCM)

Tras la hidratación de los cortes se lavó con agua destilada durante 5 minutos y se dejó en Hematoxilina de Weigert (HT1079 Sigma®) durante 5 minutos. Tras varios lavados sucesivos con agua destilada, se dejó con Fucsina en solución de Ponceau (P7170 Sigma®) durante 5 minutos. Se retiró el exceso del colorante lavando dos veces con agua, y se dejó de 2 a 4 minutos en ácido fosfomolibdico y a continuación se introdujo en una solución de Verde Luz durante 3 minutos. Tras lavados con agua y uno último con ácido acético diluido y se procedió al montaje de la muestra.

6.4 TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

Este experimento se realizó en las instalaciones del animalario del CAI de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar, UCM. Todos los animales fueron anestesiados y operados realizando el mismo procedimiento quirúrgico, descrito en el apartado 6.2, en saco muscular, a ambos lados de la columna vertebral empleando un trocito de bastidor como señalizador de la zona quirúrgica. En este caso se implantaron dos filmes por rata (Figura 26). Todos los animales fueron sometidos a un TC semanal desde la segunda hasta la sexta semana. Para la realización de la tomografía se empleó un Scanner PET/ CT Albira ARS (GEM-IMGING; Oncovision). El protocolo de adquisición fue de alta calidad (HR) a una resolución de 0,125 mm de tamaño de pixel, 45 kV/ 0,8 mA. El análisis de las imágenes se realizó con el programa Pmod 3.0, en el plano coronal.

El sacrificio se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 6.2.

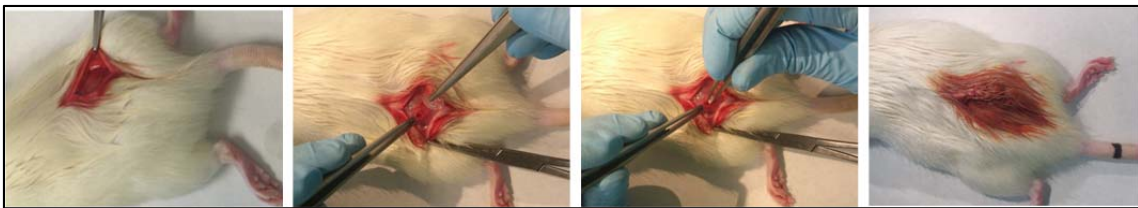


Figura 26. Imágenes de la operación del estudio mediante μ -CT, empleando filmes de quitosano a ambos lados de la columna y un marcador de POM-C para reconocer la localización exacta de la muestra.

6.5 BIODISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA

6.5.1 PROTEÍNA MARCADA

La proteína marcada se compró a la empresa PerkinElmer (rhBMP-2- 125 I referencia NEX432) a una concentración de 32 μ Ci/mL (0,5 mL con 10 μ Ci totales) y una actividad específica de 73 μ Ci/ μ g con una pureza del 95% (yodo libre menor del 5,0% desde el inicio del marcaje).

6.5.2 PREPARACIÓN DE FILMES CON Y SIN PROTEÍNA MARCADA CON ^{125}I

Se prepararon los filmes siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.1, sobre moldes de plástico estériles de 1 cm^2 de superficie (Figura 27) y empleando una solución de quitosano Q9 al 1,0% (p/v) en ácido acético 50 mM, proteína marcada con ^{125}I (2,25 $\mu\text{Ci}/\text{filme}$) y rhBMP-2 sin marcar (50 $\mu\text{g}/\text{filme}$). Previa a la formación de los filmes, se tomaron muestras de 5 μl por duplicado para cuantificar el marcaje inicial mediante un contador gamma (Cobra II auto-gamma, Packard). Las soluciones empleadas en la neutralización y lavado de los filmes fueron recogidas para la posterior cuantificación de la proteína marcada remanente en el filme y conocer la actividad inicial en el ensayo.

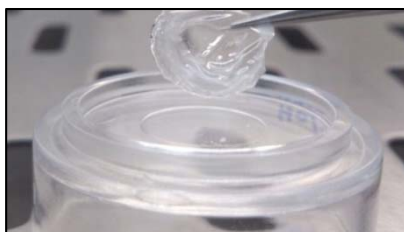


Figura 27. Imagen de un filme de quitosano con proteína marcada con ^{125}I .

6.5.3 CIRUGÍA EXPERIMENTAL

Para este estudio se emplearon 4 ratas Wistar de 125-150 g de peso. La implantación de los filmes activados con rhBMP-2- ^{125}I se realizó siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito en el 6.2. En este ensayo se implantó una sola muestra por animal en saco intramuscular en el lado derecho de la columna vertebral. Tras la operación, los animales se trasladaron a celdas metabólicas donde fueron alimentadas *ad libitum* y se sacrificaron a diferentes tiempos. Se recogieron heces y orinas durante el ensayo para cuantificar la presencia de ^{125}I en las mismas.

6.5.4 TRATAMIENTO DE MUESTRAS Y DISEÑO DE LA MARG

Los animales fueron sacrificados empleando Pentobarbital (200 μl en la vena lateral en la cola). Inmediatamente fueron congelados en una mezcla de hexano y nieve carbónica, dejándolo 10-15 minutos en la misma. A continuación se colocó el animal en un molde de aluminio (cuya base se encuentra sumergida en la mezcla hexano-nieve carbónica) y lentamente se fue añadiendo en el interior la solución de carboximetilcelulosa al 1,5% (fría)

hasta cubrir el animal por completo. Tras 15-20 minutos, se obtuvo un bloque sólido y se obtuvieron cortes de 50-100 μm a -30°C empleando un criostato (microtomo Leica CM3500). Los cortes congelados se liofilizaron a -20°C (12 horas) y a continuación se pusieron en contacto con una pantalla de fosforo fotoestimulable de 1 a 3 semanas. La pantalla de fósforo tiene la capacidad de almacenar la energía incidente en forma de electrones que pasan a un nivel excitado en la red cristalina. Posteriormente se puede obtener la imagen digital mediante barrido de la placa con láser del equipo de lectura (Molecular ImagerTM FX, Bio Rad). Dicho láser provoca la vuelta al estado fundamental de los electrones de dicha placa, emitiendo una señal luminosa que es transformada por el tubo fotomultiplicador en señal eléctrica y cuantificada por un conversor analógico digital.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento se realizó por triplicado a excepción de los ensayos *in vivo*. Los resultados se expresaron como promedio \pm la desviación estándar. Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa Prism 5 de la casa Graph Pad.

Se realizaron diferentes tratamientos y test estadísticos en función del ensayo, del número de datos experimentales y de los resultados obtenidos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la realización del presente trabajo de investigación se procedió a la adquisición de un stock de 12 quitosanos, nueve de ellos provienen de una quitina de origen crustáceo, de cangrejos de nieve (*Chionoecetes opilio*) salvo el Q9 que procede de camarón boreal (*Pandalus borealis*). Todos fueron suministrados por la empresa Biolog (Alemania) excepto Q11 y Q12, que son del mismo origen que el Q9 pero fueron adquiridos a la empresa Primex (Noruega).

Para evaluar si estos biopolímeros satisfacen los requerimientos para ser empleados como Productos Médicos en Ingeniería de Tejidos (TEMPS del inglés *Tissue Engineering Medical Products*) se estudiaron los parámetros más relevantes relacionados con la caracterización, pureza y funcionalidad de los mismos. Se emplearon las normas ASTM: F2103-02 "Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications" como guía para estos estudios.¹

1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUITOSANOS DE PARTIDA

Los quitosanos adquiridos se sometieron a una molienda para trabajar con un tamaño máximo de partícula (0,2 mm) y se almacenaron a temperatura ambiente. Todos presentaron una coloración similar, abarcando diferentes tonalidades desde un color blanco marfil hasta un blanco amarillento, como es el caso del Q4. Antes de su molienda los quitosanos se presentan en forma de escamas, pequeñas fibras o en polvo.

Una de las características importantes en cualquier quitosano comercial es el contenido en humedad y cenizas, necesarios para poder comparar de forma adecuada resultados obtenidos con quitosanos diferentes. El primero de ellos afecta de forma muy importante al peso real de polímero que se emplea para formar una disolución de una concentración dada, mientras que el segundo nos da una idea de la eficacia del proceso de desmineralización empleado en su obtención. A pesar de que las Normas ASTM describen y estipulan los procedimientos para su determinación, no establecen unos valores máximos permitidos, quedando al arbitrio de las casas comerciales los valores de los mismos. Por lo general las casas comerciales (véase Anexo I) no dan unos límites concretos para estos parámetros, sino sólo un valor máximo de los mismos, siendo común por ejemplo, para el contenido en humedad, estipular que debe ser inferior al 10-15% y en función de la aplicación final del quitosanos este valor puede llegar a ser mucho menor, alrededor de un 8%.

¹ **Nota aclaratoria:** A lo largo de este apartado se ofrecen como resultado de algunos parámetros un solo quitosano, reuniendo en el Anexo II el resto de las muestras.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los doce quitosanos diferentes utilizados en esta Tesis, realizándose cada una de las determinaciones por triplicado. El contenido en humedad obtenido fue inferior al 15% en todas las muestras, entrando dentro de los límites establecidos por las diferentes casas comerciales (Anexo I).

El porcentaje de cenizas describe la cantidad total de material inorgánico presente en la muestra, proveniente en su mayoría de sales como carbonatos y silicatos. La composición de estas sales depende de la procedencia de la quitina y el tratamiento industrial aplicado hasta la obtención del quitosano (Aranaz *et al.*, 2009). Los resultados correspondientes a la determinación de cenizas totales o residuos de ignición muestran valores menores del 1,0%, límite establecido para este parámetro en las especificaciones de calidad de las muestras comerciales reflejadas en el Anexo I, destacando como excepción, los quitosanos Q2 y Q8 con valores algo superiores (1,45 y 1,33% respectivamente).

Tabla 5. Resultados del contenido de humedad, cenizas e insolubles de las muestras de quitosano indicando la casa comercial y el origen de la quitina.

Empresa	Quitosanos	Origen	Humedad (%)	Cenizas (%)	Insolubles (%)
Biolog	Q1	Cangrejo	10 ± 0,1	0,7 ± 0,1	3,3 ± 1,3
Biolog	Q2	Cangrejo	8 ± 0,1	1,4 ± 0,5	2,9 ± 0,3
Biolog	Q3	Cangrejo	11 ± 0,2	0,6 ± 0,2	4,3 ± 0,1
Biolog	Q4	Cangrejo	13 ± 0,2	0,1 ± 0,1	2,5 ± 0,8
Biolog	Q5	Cangrejo	12 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Biolog	Q6	Cangrejo	11 ± 0,1	1,0 ± 0,1	4,1 ± 1,7
Biolog	Q7	Cangrejo	11 ± 0,1	0,9 ± 0,1	4,2 ± 2,5
Biolog	Q8	Cangrejo	12 ± 0,2	1,3 ± 0,1	3,8 ± 0,8
Biolog	Q9	Camarón	8 ± 0,1	0,4 ± 0,3	1,7 ± 0,8
Biolog	Q10	Cangrejo	12 ± 0,1	0,6 ± 0,2	5,7 ± 1,8
Primex	Q11	Camarón	8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,5
Primex	Q12	Camarón	7 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2

Como se puede observar del examen de los valores de la Tabla 5, la variabilidad de estos parámetros, tanto en el contenido en humedad como de insolubles, es importante. Esto afecta de forma muy real a la concentración efectiva de quitosano en una disolución dada,

dificultando la obtención de datos reproducibles y las comparaciones entre experimentos realizados en diferentes laboratorios si no se suministra esta información.

El contenido de insolubles se debe a la presencia de restos de quitina o quitosanos con muy bajo grado de desacetilación, presencia de sales y otros contaminantes que no se disuelven en ácidos diluidos. Este contenido de insolubles normalmente no es determinado ni informado por las casas comerciales y en nuestro caso, los valores fueron menores del 5,7% destacando los quitosanos Q5, Q9, Q11 y Q12 como las muestras con menor cantidad de insolubles.

Dentro del contenido en cenizas están los metales pesados presentes en el quitosano de partida. Este parámetro sí puede afectar de forma significativa al uso de los mismos en aplicaciones biomédicas, siendo especialmente importante para las mismas el contenido en Hg y Pb. A continuación se muestra en la Tabla 6 los resultados del contenido de metales pesados de los quitosanos, junto con los porcentajes de carbono y nitrógeno determinados para los mismos.

Tabla 6. Contenido de metales pesados, porcentajes de carbono y nitrógeno presentes en las muestras de quitosano.

Quitosanos	Hg (ppm)	Pb (ppm)	Carbono (%)	Nitrógeno (%)
Q1	< 0,004	< 0,065	40	7
Q2	< 0,003	< 0,070	41	7
Q3	< 0,002	< 0,073	40	7
Q4	< 0,002	< 0,062	40	7
Q5	< 0,008	< 0,061	39	7
Q6	< 0,003	< 0,068	40	7
Q7	< 0,003	< 0,067	40	7
Q8	< 0,002	< 0,069	40	7
Q9	< 0,005	< 0,063	41	8
Q10	< 0,010	< 0,069	40	7
Q11	< 0,001	< 0,061	41	7
Q12	< 0,001	< 0,061	41	8

Como se puede observar en la Tabla 6 todos los quitosanos mostraron niveles adecuados de metales pesados, inferiores a 0,2 ppm de Hg e inferiores a 0,1 ppm de Pb, según informan las casa comerciales (Anexo I).

Los porcentajes de carbono y nitrógeno obtenidos son compatibles con la fórmula molecular del quitosano, estando los valores entre un 7-8% para el nitrógeno, como se puede apreciar en la Tabla 6 y coinciden con los valores descritos en otros trabajos (Dutta *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004; Galed-Ceresuela, 2006).

En la Figura 28 se muestran los espectros de rayos X correspondientes a los distintos quitosanos empleados. En ellos se aprecian los dos picos cristalinos aproximadamente a $2\theta = 9$ y $19,4$ indicativos de la estructura típica del quitosano. Una de las diferencias primordiales entre las estructuras de quitina y quitosano radica en su carácter cristalino. Mientras que la quitina presenta un difractograma de una sustancia prácticamente cristalina, en las moléculas de quitosano en estado sólido coexisten regiones cristalinas con regiones amorfas produciendo un espectro típico de una sustancia semicristalina (Brugnerotto *et al.*, 2001a; Peniche, 2006).

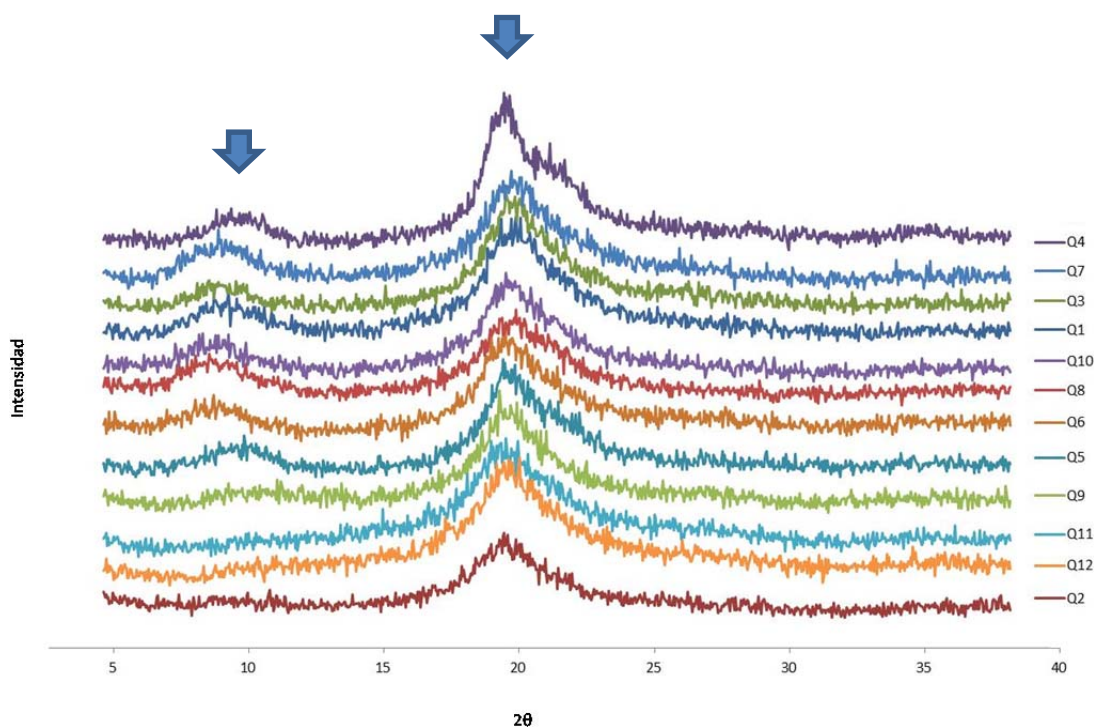


Figura 28. Difractograma de rayos X de las muestras en orden descendente aproximado de cristalinidad donde se aprecian los picos a 2θ propios del polímero (flechas).

El Índice de cristalinidad (IC) calculado a partir de estos espectros, se muestra en la Tabla 7. Dicho índice de cristalinidad varió desde un 66% hasta un 81%, siendo el Q11 y el Q4 los quitosanos con menor y mayor IC respectivamente, influyendo este parámetro en la disolución del polímero.

Otro parámetro fundamental característico del quitosano es su grado de desacetilación (DD), que representa el contenido de grupos amino libres presentes en el polisacárido. Existen numerosos métodos que nos permiten calcular el grado de desacetilación, como son las técnicas espectroscópicas (IR, UV, RMN), potenciométricas y conductimétricas. Entre las posibles técnicas disponibles se ha elegido para este trabajo la Espectroscopia de ^1H -RMN ya que resulta un método sencillo, rápido, muy útil para el estudio de las estructuras químicas y estéricas de los polisacáridos. La Figura 29 muestra un ejemplo del espectro ^1H -RMN correspondiente al Q5, en el que se aprecian las señales de desplazamiento químico de los protones concordantes con los valores de literatura (Hirai *et al.*, 1991).

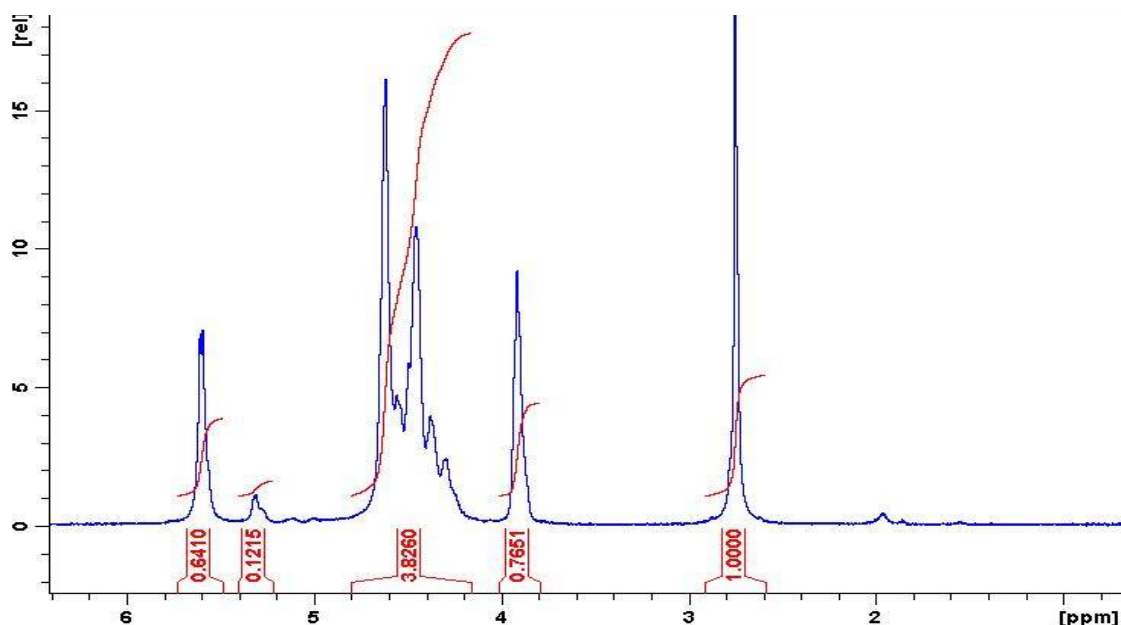


Figura 29. Espectro de ^1H -RMN del quitosano Q5. Se muestra Q5 como ejemplo representativo cuyo DD fue en este caso del 84%. Los demás espectros de los quitosanos se presentan en el Anexo II.

Los valores obtenidos del DD para todos los quitosanos se presentan en la Tabla 13, pudiéndose observar los resultados desde un 73% hasta un 92%. El conocimiento de este parámetro estructural es fundamental puesto que va a influir en la solubilidad, hidrofiliidad, densidad de cargas, cristalinidad e incluso la biodegradabilidad de los quitosanos. Destacamos como quitosanos con menor DD el Q1 y el Q10 con un 73% mientras que el Q12 el de mayor DD con un 92%.

El quitosano en solución adquiere una forma de hélice extendida y la viscosidad de dicha solución aporta información sobre el Mw del polímero (Weinhold *et al.*, 2009). Dicho

parámetro se encuentra relacionado con la viscosidad intrínseca y ésta a su vez viene determinada por el tamaño y la conformación de las moléculas individuales del polímero en solución.

El peso molecular promedio en masa viscosimétrico (\overline{M}_v), obtenido para los quitosanos en solución a través del estudio de la viscosidad intrínseca, empleando el solvente Rinaudo (0,3 M ácido acético/0,2 M acetato de sodio, pH 5,4) mostró un amplio abanico de valores desde 249 KDa (Q4) hasta aproximadamente 1400 KDa (Q10), plasmados en la Tabla 7 (Rinaudo *et al.*, 1993; Rinaudo, 2006).

Tabla 7. Resultados de Índice de cristalinidad, grado de desacetilación, pesos molecular, viscosidad rotacional e intrínseca de todos los quitosanos.

Quitosanos	IC (%)	DD (%)	Mw (kDa)	η Rotacional (cP)	η intrínseca (dl / g)*
1	74 ± 2	73 ± 2	960 ± 17	734 ± 15	44 ± 3
2	70 ± 3	77 ± 3	655 ± 63	310 ± 10	31 ± 2
3	72 ± 2	74 ± 2	850 ± 49	421 ± 33	35 ± 3
4	82 ± 1	83 ± 3	249 ± 32	50 ± 3	17 ± 1
5	76 ± 1	82 ± 2	617 ± 51	236 ± 12	26 ± 4
6	78 ± 4	75 ± 2	1084 ± 22	761 ± 32	35 ± 3
7	77 ± 2	74 ± 4	1186 ± 16	1131 ± 50	49 ± 4
8	72 ± 3	74 ± 2	730 ± 15	317 ± 10	39 ± 4
9	70 ± 2	84 ± 2	607 ± 36	179 ± 5	22 ± 4
10	73 ± 1	73 ± 4	1362 ± 27	1334 ± 60	60 ± 3
11	66 ± 1	85 ± 1	442 ± 32	75 ± 3	18 ± 1
12	67 ± 1	92 ± 2	418 ± 18	79 ± 3	20 ± 1

*Determinada en AcH 50mM por microviscosimetría capilar

Un parámetro importante proporcionado por todas las casas comerciales que refleja en gran manera la facilidad de trabajo con el polímero en solución es la viscosidad rotacional, informada siempre en soluciones de ácido acético diluido. En nuestro trabajo se ha utilizado en gran medida la técnica de microviscosimetría capilar, ya que permite emplear poca cantidad de muestra y se trabaja con soluciones diluidas (de comportamiento newtoniano) proporcionando la viscosidad intrínseca $[\eta]$.

Un estudio comparativo de los resultados obtenidos de las dos viscosidades muestra una buena correlación entre ambas para casi todos los quitosanos (Figura 30) encontrando la siguiente relación lineal:

$$[y = (19,08 \pm 2,04) + (0,029 \pm 0,003) x]$$

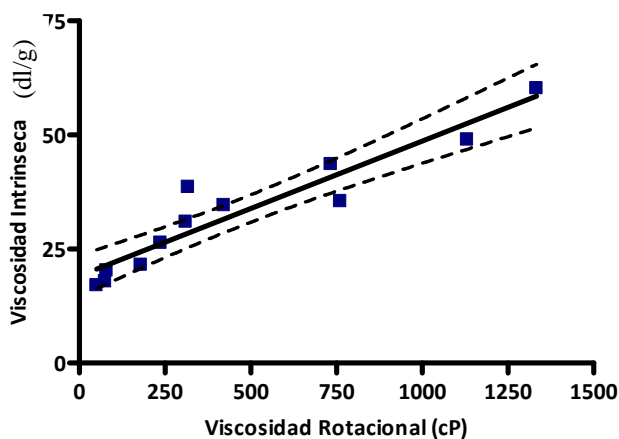


Figura 30. Ajuste comparativo de los valores obtenidos de la viscosidad intrínseca frente a la rotacional para todas las muestras ($r^2 = 0,8912$).

Dicha relación sugiere para la gran mayoría de los quitosanos estudiados que, las fuerzas intermoleculares entre las cadenas (proporcionada por su viscosidad rotacional) son proporcionales al volumen hidrodinámico de las mismas (determinada por la viscosidad intrínseca a dilución infinita).

Comparando los resultados obtenidos de estos quitosanos con los parámetros fisicoquímicos suministrados por las casas comerciales (Anexo I), se puede observar que los mismos se encuentran dentro de los límites para usos biomédicos y farmacéuticos. Existen algunos parámetros como la viscosidad o el DD, que se sitúan fuera de los valores límite de algunas casas comerciales. Sin embargo, este hecho no es excluyente, considerándose de gran importancia evaluar los filmes de los mismos en los siguientes apartados.

El estudio detallado realizado de los diferentes quitosanos comerciales nos permite, además de comprobar la identidad del producto, conocer los parámetros fisicoquímicos reales que puedan relacionarse con propiedades de biocompatibilidad y biodegradación de los filmes de quitosano.

Por razones de índole práctico, se decidió agrupar los quitosanos en función de su Mw en tres grandes grupos, aunque alguno de ellos como el Q8 y Q9, pueden situarse en diferentes grupos indistintamente:

- Mw Alto: Q1, Q3, Q6, Q7, Q8 y Q10 presentando un DD alrededor de 75%.
- Mw Intermedio: Q2, Q5, Q8 y Q9 con un DD cercano al 80%.
- Mw Bajo: Q4, Q9, Q11 y Q12 con un DD igual o superior al 85%.

2. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS FILMES DE QUITOSANO

Una vez caracterizado el material de partida, se procedió a la preparación de filmes de los diferentes quitosanos según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.1). En todos los casos, y para todas las concentraciones ensayadas, se obtuvieron filmes homogéneos y transparentes tal y como se puede observar en la Figura 31.

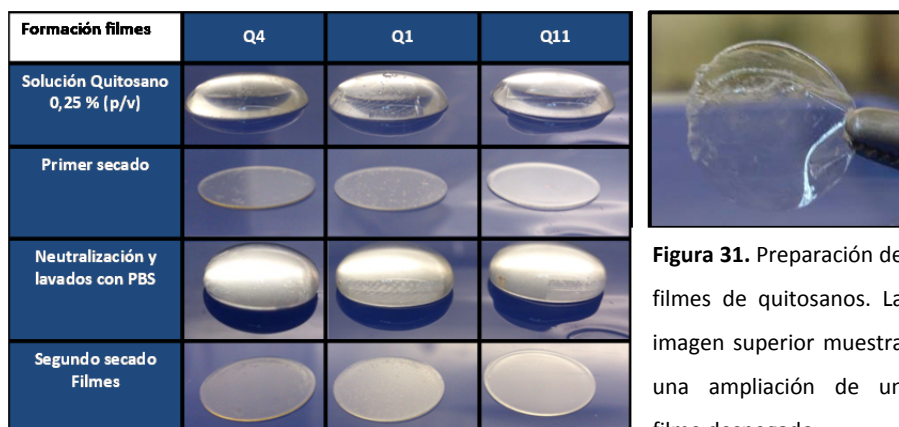


Figura 31. Preparación de filmes de quitosanos. La imagen superior muestra una ampliación de un filme despegado.

La técnica de Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) aporta información cualitativa acerca de los grupos funcionales presentes en el polímero. Los espectros obtenidos mediante esta técnica se emplearon para confirmar la identidad del quitosano en los filmes. A modo de ejemplo se presenta en la Figura 32 los espectros de los filmes, de todos los quitosanos empleados en este estudio, donde se puede observar las bandas características de los diferentes grupos del polímero.

Las bandas de vibración a 3250 y 3400 cm^{-1} corresponden al grupo -OH y -NH respectivamente, característicos de alcoholes, aminas y amidas presentes en la estructura del quitosano. Las bandas de tensión a 2850 y 2930 cm^{-1} pertenecen al metilo y/o metileno, a 1651 cm^{-1} aparecen bandas de tensión correspondientes a amida de tipo I, 1577 cm^{-1} a amida de tipo II y a 1377 cm^{-1} las bandas del -CH₂. A continuación se distinguen las bandas características de los polisacáridos (a 1050 cm^{-1} de alcohol primario y 1077 cm^{-1} alcohol secundario) (Nunthaid *et al.*, 2001).

Los espectros FT-IR de todas las muestras de los filmes de los quitosanos revelan un patrón de bandas similar, característico del propio polímero.

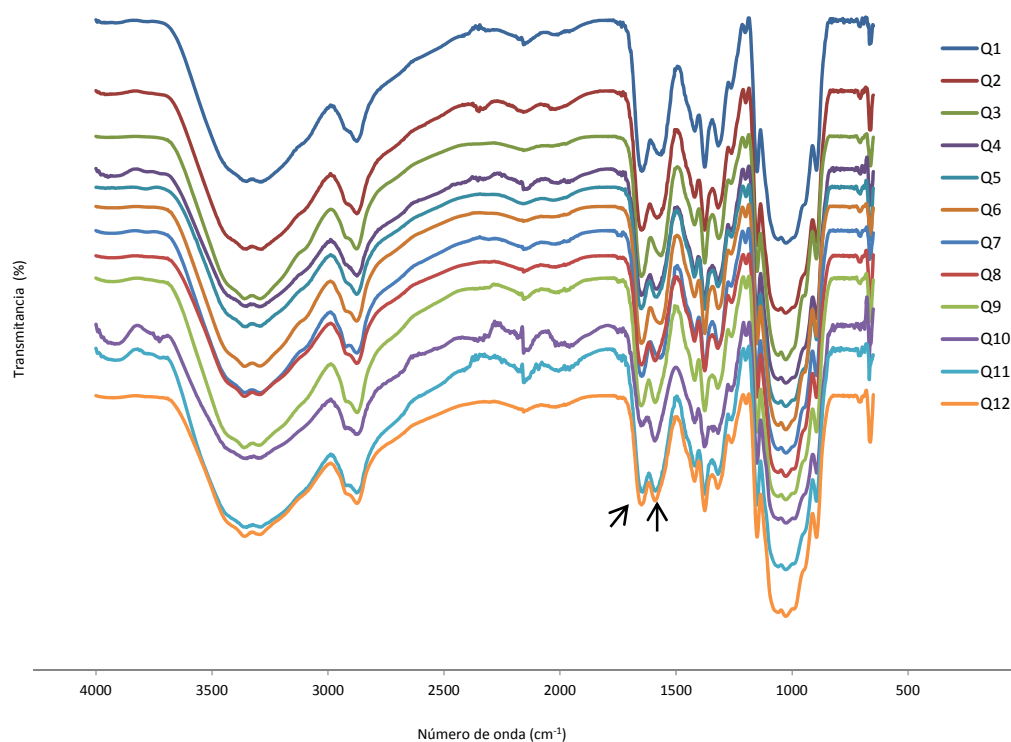


Figura 32. Espectro Infrarrojo FT-IR de los filmes donde se aprecian bandas características del quitosano. Se han señalado con flechas las bandas de tensión de los grupos amina y amida a 1651 y 1577 respectivamente.

Un parámetro crítico en las propiedades biológicas de cualquier biomaterial es la superficie. De ella, la rugosidad (S_a) es especialmente importante en la integración de los biomateriales en TE (Bumgardner *et al.*, 2003b).

Una primera visualización cualitativa de las superficies se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las imágenes obtenidas (véase la Figura 33-A) fueron en todos los casos muy similares, independientemente del quitosano estudiado y de la concentración del mismo en la solución empleada para su preparación. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por Bhuvaneshwari y colaboradores donde observaron superficies lisas y sin poros en filmes de quitosano (Bhuvaneshwari *et al.*, 2007).

En la misma Figura 33-B también se muestra un ejemplo de las distintas superficies y rugosidades que presentan los filmes de quitosano (Q11 en función de la concentración del polímero empleado en la formación de los mismos) y en la Figura 33-C, en función de tres quitosanos distintos preparados a una misma concentración (1,0%)

A través del programa SPIP™ se determinaron los valores de S_a obtenidos mediante microscopía interferométrica (MI) de los filmes de cada uno de los quitosanos empleados en este estudio, utilizando diferentes concentraciones de la solución de casting (Figura 33-D).

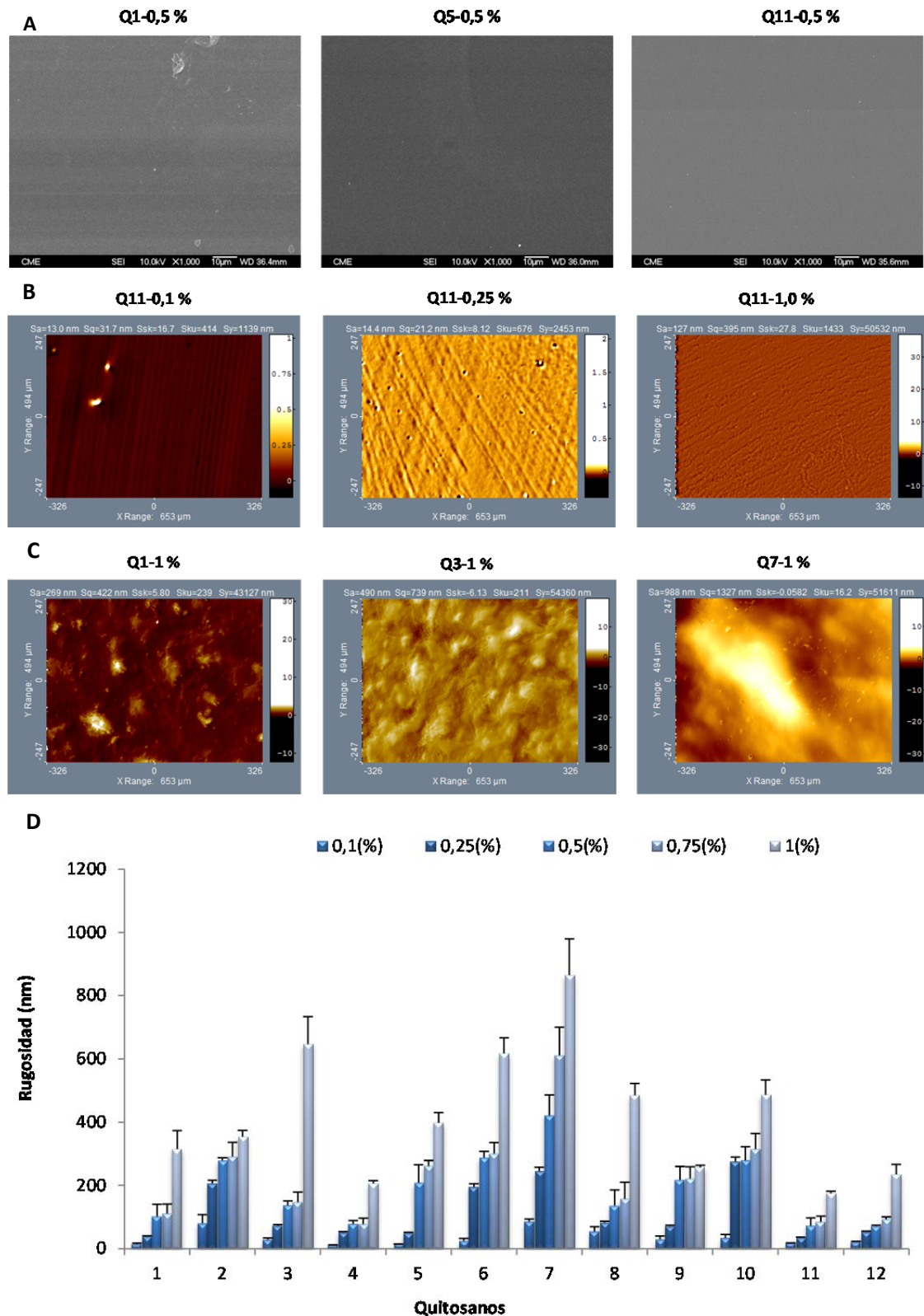


Figura 33. Estudio de la superficie de los filmes. (A) SEM de filmes de quitosanos (0,5%) a 1000x. (B) Imágenes de la rugosidad de filmes de Q11 con diferente concentración de polímero (0,1; 0,25 y 1,0%). (C) Imágenes de la rugosidad de tres quitosanos diferentes (Q1, Q3 y Q7 a una misma concentración (1,0%). (D) Gráfica de los valores de Sa de los filmes a diferentes concentraciones (mediante MI).

Un análisis de esta figura indica que en todos los casos existe un aumento de la rugosidad al aumentar la concentración de la solución empleada. Un ANOVA de dos vías de estos valores indica que existe una influencia significativa de ambos factores (tipo de quitosano y concentración). No obstante, dado que la interrelación entre variables en dicho análisis es también muy significativa, es difícil hacer conclusiones certeras de los valores de significación para cada variable por separado.

Ante esto se nos ofrecen varias posibilidades para poder obtener alguna conclusión de los datos presentados. En primer lugar, podemos prescindir de la variable tipo de quitosano y tratar los datos como provenientes de un único "pool", dado que en todos ellos es evidente la fuerte influencia de la concentración en los valores de rugosidad obtenidos. Se obtendría en este caso la representación de la Figura 34 donde se ofrece tanto el ajuste lineal como los intervalos de confianza del 95%, siendo el coeficiente de correlación $r^2 = 0,9153$ y la ecuación del ajuste obtenido la siguiente:

$$y = (-12,68 \pm 50,60) + (469,1 \pm 82,42) x$$

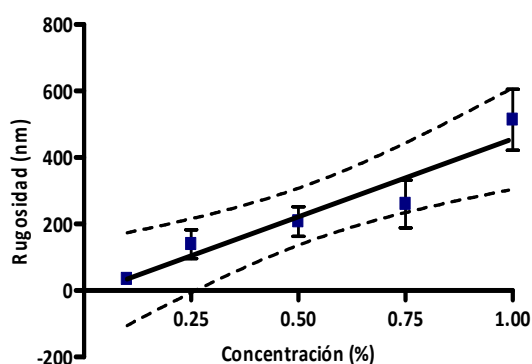


Figura 34. Ajuste lineal de los valores de rugosidad (S_a) obtenido de todos los quitosanos frente a la concentración de la solución de polímero empleada para realizar

La principal utilidad que presenta este ajuste (aun siendo consciente de la influencia de la variable quitosano) es proporcionar una primera aproximación a los resultados que cabe esperar de rugosidad, independientemente del tipo de quitosano empleado. Naturalmente que, una vez seleccionado el quitosano y la concentración, la rugosidad que se determine experimentalmente diferirá de la prevista, pero no más que en unos márgenes ya señalados por las curvas del 95% mostradas y que, dependiendo del trabajo a realizar, pueden ser más que suficientes.

Por otra parte, si se necesita hacer un trabajo más preciso, es posible otra aproximación al análisis de los datos. En todos los casos, para cada quitosano individual, es posible hacer una regresión como la mostrada en la figura anterior, estando los coeficientes de correlación obtenidos entre 0,82 y 0,98. Naturalmente las pendientes no coinciden para los

distintos quitosanos, pero es posible agruparlos en tres categorías (alto, medio y bajo Mw, tal y como se indicó al final del apartado precedente) y comparar las pendientes obtenidas de la regresión lineal para los diferentes quitosanos. Los resultados que se obtienen, cuando se comparan sólo quitosanos dentro de una de estas categorías, es que no existen entre ellos diferencias significativas en los valores de la pendiente obtenida, por lo que se puede hacer una regresión común en cada grupo sin tener en cuenta el tipo de quitosano concreto que está en él. Tal aproximación lleva a la siguiente Figura 35.

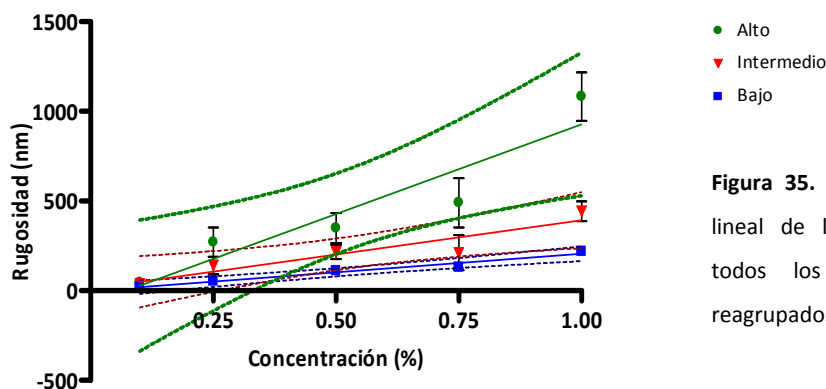


Figura 35. Representación del ajuste lineal de los valores de rugosidad todos los filmes de quitosanos reagrupados en función de su Mw.

Se puede observar en esta gráfica que la rugosidad depende fuertemente del Mw del quitosano empleado a altos valores de concentración, mientras que para valores bajos (0,1%) la rugosidad es prácticamente la misma independientemente del tipo de quitosano. Por otra parte este ajuste permite afinar el proceso de selección del quitosano a emplear en función de los valores de rugosidad pretendidos.

Otro parámetro de gran importancia que se puede obtener de los filmes es el espesor. Especialmente en el caso de los polímeros biodegradables empleados como transportadores de moléculas bioactivas, el espesor del filme es un parámetro de gran relevancia, ya que influye tanto en la cinética de liberación de éstas como en el tiempo de residencia del transportador en el organismo.

Es precisamente la capacidad de hacer reconstrucciones 3D de las imágenes obtenidas por MI lo que nos permite determinar asimismo el espesor de los filmes obtenidos. De forma sencilla realizando un simple corte en el mismo filme que deje al descubierto la superficie sobre la que se ha formado (normalmente disco de vidrio de 1 cm²) y detectando el instrumento el escalón existente entre ambas (Figura 36).

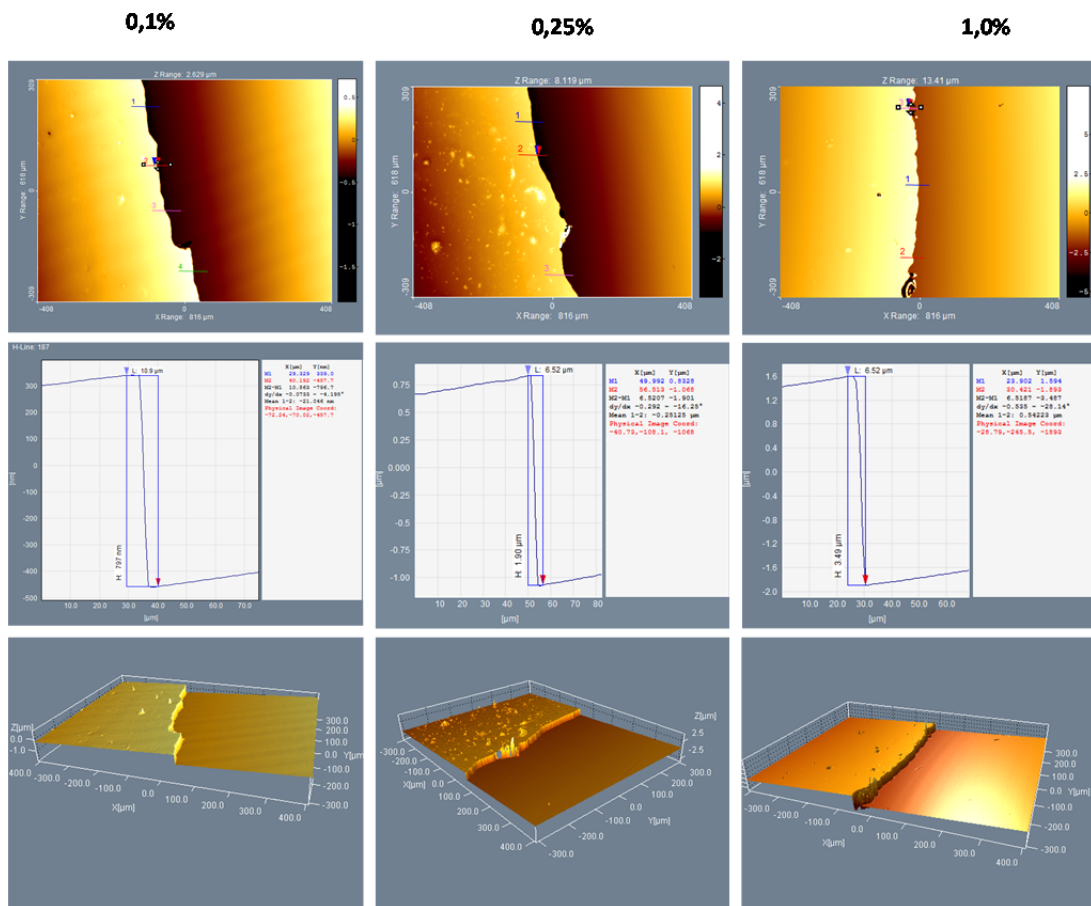


Figura 36. Ejemplo representativo de la determinación del espesor de filmes de Q11 preparados a diferentes concentraciones. Se muestra la superficie del filme, la determinación del espesor mediante el corte y la imagen 3D del mismo, empleando MI y el programa SPIP™.

Se realizó un ajuste lineal de los espesores obtenidos en función de la concentración de la disolución empleada para cada uno de los quitosanos estudiados, observándose una relación lineal. Los datos obtenidos se ofrecen en la Tabla 8.

El valor del coeficiente de correlación obtenido fue mayor de 0,92 en todos los casos. El test de igualdad de pendientes realizado con los valores ajustados condujo a la conclusión de que éstas no eran significativamente diferentes ($P=0,19$), por lo que se optó por hacer un ajuste conjunto de todos los datos de espesor. Independientemente del tipo de quitosano y en función de la concentración de la solución empleada se obtuvo, para este ajuste global, una relación lineal con un coeficiente de correlación de 0,94 y la siguiente ecuación:

$$y = (0,22 \pm 0,14) + (6,94 \pm 0,25) X.$$

Tabla 8. Resultados del ajuste lineal del espesor (μm) del filme obtenido en función de la concentración para cada quitosano.

Quitosanos	R2	Ecuación
Q1	$r^2 = 0,980$	$y = 8,39x - 0,30$
Q2	$r^2 = 0,973$	$y = 7,16x + 0,37$
Q3	$r^2 = 0,926$	$y = 5,97x + 0,06$
Q4	$r^2 = 0,997$	$y = 6,21x + 0,61$
Q5	$r^2 = 0,966$	$y = 7,08x + 0,24$
Q6	$r^2 = 0,999$	$y = 7,91x - 0,20$
Q7	$r^2 = 0,984$	$y = 6,73x + 0,15$
Q8	$r^2 = 0,975$	$y = 6,69x + 0,40$
Q9	$r^2 = 0,963$	$y = 7,91x + 0,22$
Q10	$r^2 = 0,987$	$y = 4,84x + 0,60$
Q11	$r^2 = 0,965$	$y = 7,33x + 0,28$
Q12	$r^2 = 0,980$	$y = 7,31x + 0,17$

Otro de los parámetros clave en el desempeño de los filmes de quitosano como soporte para la adhesión y proliferación celular, como se mostrará posteriormente, es el proceso de neutralización del filme. Para evaluar si este factor influye de alguna forma en el espesor del filme obtenido, se realizó un estudio similar al expuesto anteriormente, usando otras concentraciones del agente estabilizador, desde sin estabilizar hasta neutralización con tampón fosfato 1 M.

Se pudo comprobar de nuevo que para diferentes quitosanos el único factor que influye en el espesor del filme es la concentración del polímero empleado para su formación. Este hecho se observa claramente en la Figura 37-B, donde se muestra el ajuste global, tras el test de igualdad de pendientes similar al realizado en el apartado anterior, de los datos correspondientes a los filmes sin neutralizar.

Los resultados del ajuste son muy similares al obtenido para la neutralización con tampón fosfato 0,25 M (Figura 37-A) obteniéndose en este caso la siguiente ecuación de la recta:

$$y = (-0,07 \pm 0,22) + (7,45 \pm 0,38) x$$

siendo el coeficiente de correlación de 0,928. Resultados similares se obtienen de los ajustes de espesor frente a concentración de quitosano cuando el agente neutralizante es 0,5 M; 0,75 M o 1 M.

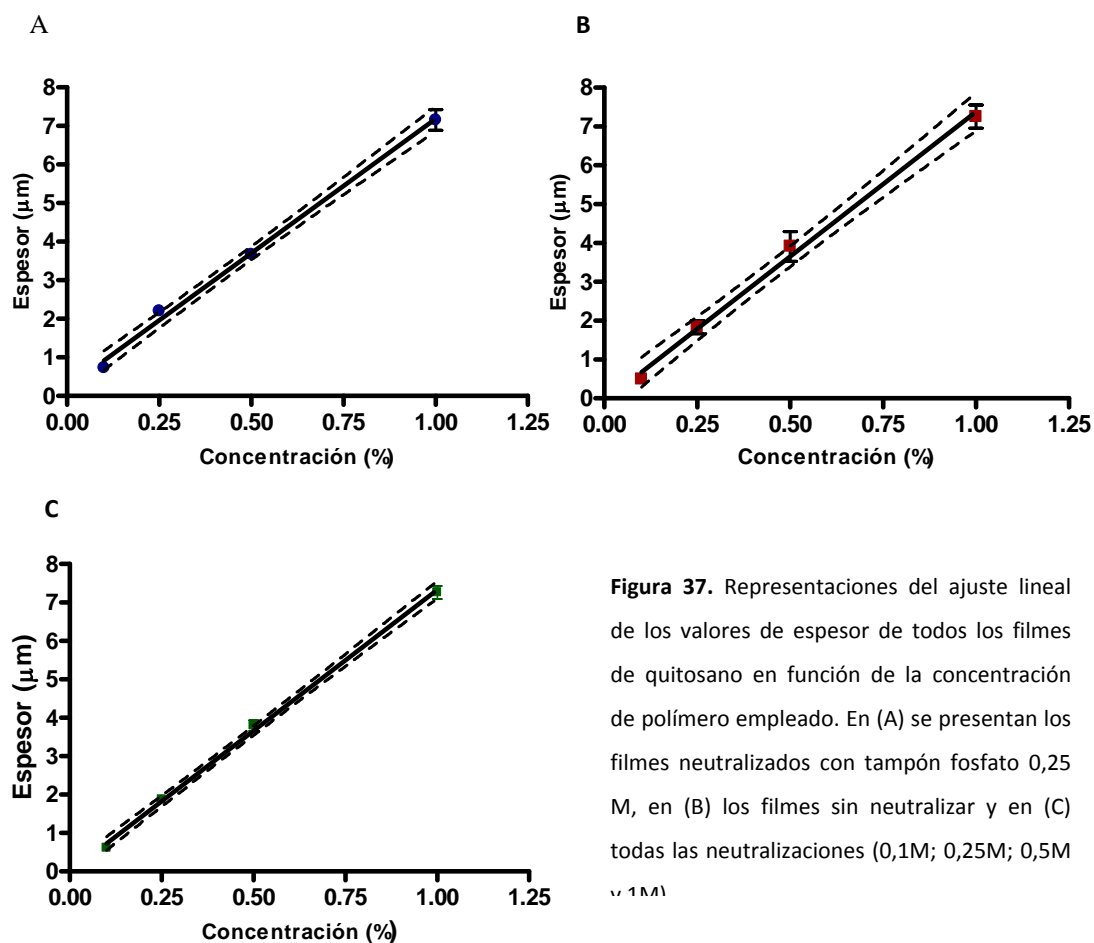


Figura 37. Representaciones del ajuste lineal de los valores de espesor de todos los filmes de quitosano en función de la concentración de polímero empleado. En (A) se presentan los filmes neutralizados con tampón fosfato 0,25 M, en (B) los filmes sin neutralizar y en (C) todas las neutralizaciones (0,1M; 0,25M; 0,5M y 1,1M).

Si se comparan entre sí las rectas obtenidas para las diferentes condiciones de neutralización se obtiene, tras el test de igualdad de pendientes, que todos los datos se pueden considerar de una misma recta, independientemente del tipo de quitosano y proceso de neutralización sufrido, por lo que se realizó un ajuste global de todos los datos obtenidos, representando espesor del filme frente a concentración de quitosano sin tener en cuenta el origen de los datos. Los resultados de dicho ajuste se ofrecen en la Figura 37-C cuya ecuación de recta es:

$$y = (-0,0053 \pm 0,1033) + (7,334 \pm 0,1796) x$$

presentando un coeficiente de correlación $r^2 = 0,942$.

Se evaluó asimismo la hidrofiliidad de la superficie del filme de quitosano a través de la medida del ángulo de contacto (θ), siendo este parámetro otro factor directamente relacionado con el comportamiento celular. Los ángulos de contacto superiores a 90° son característicos de superficies hidrófobas, donde el líquido apenas “moja” la superficie. Sin

embargo, valores de θ inferiores a 90° indican que el biomaterial presenta un carácter hidrófilo favoreciendo los procesos celulares de adhesión y proliferación (Yuan y Lee, 2013).

Se realizó un estudio de la influencia de la concentración de quitosano en el filme sobre el ángulo de contacto. Se emplearon las concentraciones desde 0,1% hasta 1,0% (p/v) para los quitosanos Q5, Q11 y Q12, mostrándose los resultados que se obtuvieron para el caso del Q5 en la Figura 38. El ANOVA de una vía realizado sobre los resultados indica que no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones ($P = 0,09 > 0,05$). En todos los casos, los valores obtenidos para el Q5, Q11 y Q12 se correlacionan con valores descritos para filmes de quitosano por otros autores (Neamark *et al.*, 2007; Abarrategi *et al.*, 2008a; Bumgardner *et al.*, 2008; Lieder *et al.*, 2012).

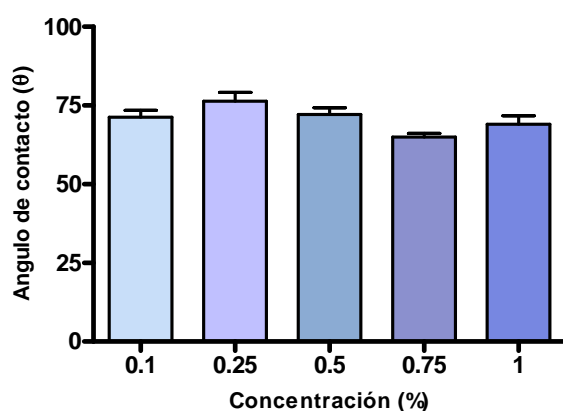


Figura 38. Representación de los valores θ del filme de quitosano Q5 en función de la concentración de polímero en el filme.

Por esta razón, se decidió realizar un análisis similar con los demás quitosanos (los cuales se determinaron únicamente de 2 a 4 concentraciones de las anteriormente mencionadas) agrupando todos los datos correspondientes a cada quitosano sin tener en cuenta la concentración del filme, y se procedió al estudio de la posible influencia del tipo de quitosano en el valor de θ cuyos resultados se muestran en la Figura 39.

El análisis de 1 vía indica que existen diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los diferentes quitosanos, obteniéndose al realizar el post-test de todos los filmes frente al control, la no significación para todos los quitosanos excepto para el Q2, Q4, Q7 y Q10, donde su valor de P es menor de 0,05.

Si eliminamos estos quitosanos y comparamos ahora el resto entre sí en el ANOVA de una vía obtenemos un valor de $P > 0,05$; indicando que no existen diferencias significativas entre ellos, al menos desde el punto de vista de hidrofiliidad de la superficie. Un análisis similar entre los quitosanos Q2, Q4, Q7 y Q10 (diferentes del vidrio control) indica también que no existen diferencias significativas entre los mismos ($P = 0,912$).

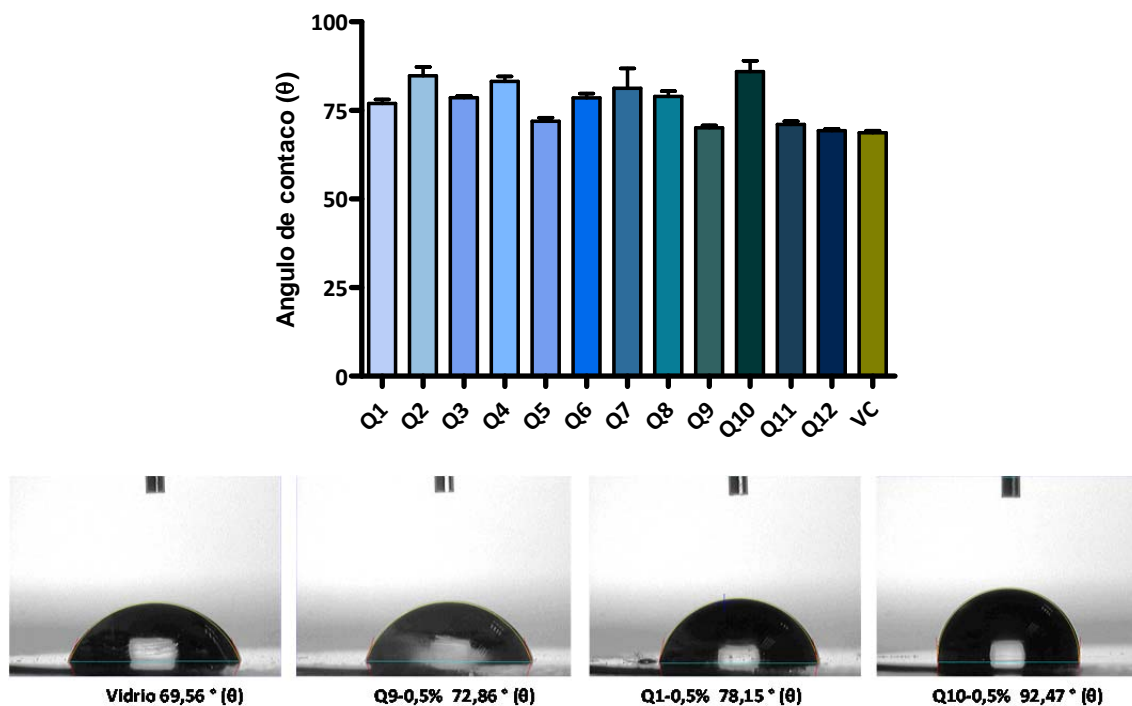


Figura 39. Representación de los valores de ángulo de contacto (θ) de todos los filmes de quitosano sin tener en cuenta la concentración de polímero empleada en la formación de los mismos e imágenes del (θ) de vidrio control (VC) y tres quitosanos diferentes, Q9, Q1 y Q10.

Por lo tanto se puede considerar los filmes de quitosanos como superficies hidrofílicas, aptas para cultivos celulares (ya que presentan ángulos de contacto inferiores a 90°) destacando el carácter moderadamente hidrofílico de los filmes Q2, Q4, Q7 y Q10 cuyos valores de θ fueron superiores (entre 80° y 90°) indicativos de superficies más hidrófobas en comparación con el resto de quitosanos.

El estudio de la capacidad de absorción de un medio acuoso por parte del filme y el consiguiente aumento de volumen del mismo, presenta gran interés en los procesos de liberación de factores bioactivos. La determinación del grado de hinchamiento se realizó por el método gravimétrico indicado en Materiales y Métodos (apartado 3.7).

Los resultados obtenidos para quitosanos representativos de los diferentes Mw, preparados al 1,0% utilizando como medio de hinchamiento tampón PBS (pH 7,4) se ofrecen en la figura siguiente (Figura 40).

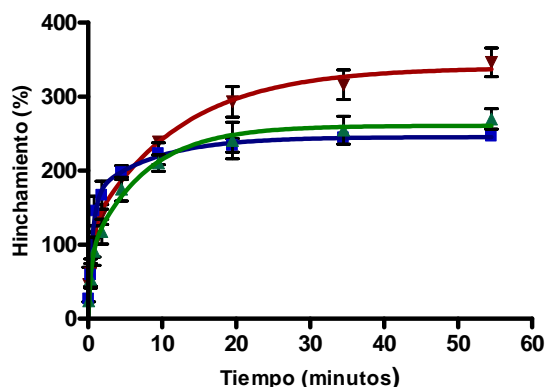


Figura 40. Porcentaje de hinchamiento de los filmes de Q1, Q5 y Q9 (al 1,0%) y representativos de los diferentes grupos de Mw en medio PBS a pH 7,4.

En ella se han ajustado los datos a un modelo exponencial de una fase:

$$Y=Y_0 + (\text{Plateau}-Y_0)*(1-\exp(-K*x))$$

estando el valor de r^2 para todos los casos comprendido entre 0,88 y 0,93. En el caso de los quitosanos de Mw intermedio (Q5 y Q9) se hizo un test adicional sobre la igualdad de parámetros de los ajustes obtenidos, es decir, se contrastó si el comportamiento para ambos quitosanos se podía describir por una sola ecuación para ambos o si bien las diferencias de comportamiento observadas exigían dos curvas independientes. Los resultados obtenidos condujeron a que una sola curva podía describir adecuadamente ambos quitosanos ($P = 0,06$).

Se puede observar que el hinchamiento es un proceso extremadamente rápido, de hecho el ajuste implica que a $t=0$ ya se ha producido un hinchamiento (de forma que en el primer dato de tiempo disponible, a 10 segundos, hay un valor de hinchamiento que oscila entre un 30 y un 50%).

Una conclusión importante que se extrae de esta gráfica es la influencia del Mw en el nivel máximo de hinchamiento conseguido, siendo tanto mayor éste cuanto mayor sea el Mw del quitosano en cuestión, como se observa en el Q1. El DD también es un parámetro que influye en el hinchamiento (Baskar *et al.*, 2009), sin embargo en nuestro caso apenas hay diferencias de DD entre los quitosanos Q5 y Q9, mostrando el mismo patrón hinchamiento.

Se realizó un estudio similar en medio ácido (pH 5,4) dado que, como se ha indicado en la Introducción, este tipo de valores de pH se puede alcanzar en el proceso de inflamación durante la reparación de heridas (Liu *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 41.

El análisis de los resultados es más complejo que en el caso anterior, debido a que se están produciendo simultáneamente dos fenómenos diferentes.

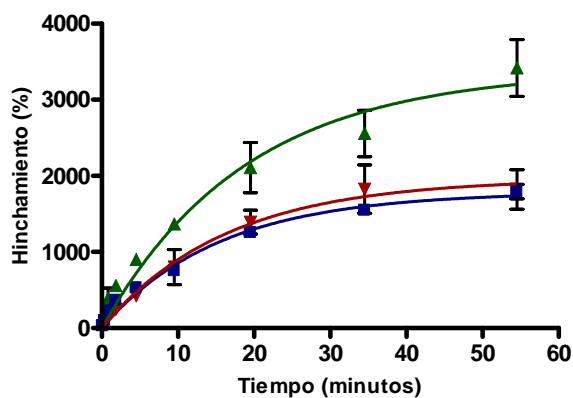


Figura 41. Porcentaje de hinchamiento de los filmes de Q1, Q5 y Q9 (al 1,0%) en medio AcH/AcONa a pH 5,4.

Por una parte el proceso de hinchamiento propiamente dicho, que en principio debería ser similar al anterior y por otra el fenómeno de redisolución del filme, siendo el quitosano soluble a este valor de pH con el medio de contacto. Este hecho se refleja en los valores tan elevados de hinchamiento obtenidos en estas condiciones, que muestran la formación más que de un filme hidratado, de un hidrogel de quitosano (corroborado tras observar el aspecto final de los filmes).

No obstante, los valores obtenidos del ajuste a proceso exponencial presentan valores de r^2 comprendidos entre 0,88 y 0,94, y las distintas curvas obtenidas reflejan, en nuestra opinión, y como se verá en apartados posteriores, más el proceso de redisolución que el de hinchamiento.

Como resumen de los resultados obtenidos en este apartado, en el cual se han caracterizado diferentes parámetros fisicoquímicos de potencial relevancia para las futuras aplicaciones de los mismos, se puede señalar que mediante la evaporación de solvente se han obtenido filmes de quitosano transparentes, homogéneos y reproducibles.

Se ha encontrado una relación lineal entre la rugosidad del filme con la concentración empleada, obteniéndose rectas diferentes para cada uno de los grupos de quitosanos en función del Mw.

Mediante una relación lineal es posible predecir el espesor del filme, que depende sólo y exclusivamente de la concentración del polímero y es independiente de la concentración del agente neutralizante. El proceso de neutralización de los filmes no modifica el espesor de los mismos.

Con respecto a la hidrofiliidad de los filmes todos muestran ángulos de contacto θ inferiores a 90° siendo superficies aptas para el crecimiento celular. Se ha observado la existencia de dos grupos diferentes, unos que presentan diferencias significativas con respecto

al vidrio control (superficies moderadamente hidrofílicas) y otro grupo más numeroso, que son equivalentes al mismo (superficies hidrofílicas).

Se ha observado el hinchamiento como un proceso rápido. El nivel máximo de hinchamiento depende del Mw del polímero y del valor de pH del medio, alcanzando mayores porcentajes de hinchamiento los quitosanos con mayor Mw.

3. DEGRADACIÓN ÁCIDA Y ENZIMÁTICA DEL QUITOSANO

En un primer lugar se decidió evaluar el comportamiento límite de la degradación de la solución y los filmes de quitosano empleando una enzima hidrolítica específica, la quitosanasa. Esta enzima, aunque no está presente de forma natural en el organismo de mamíferos, nos permitirá conocer y determinar la velocidad máxima de degradación que es posible conseguir en el quitosano en medios biológicos.

Dicho estudio se realizó empleando tampón acético acetato de sodio 0,1 M a pH 5,4 a 37 °C, en contacto con uno de los quitosanos empleados Q11 (1,0%) evaluando su cinética de degradación tanto directamente en solución como en los filmes resultantes de éste. Se determinó la viscosidad dinámica en función del tiempo, siendo la concentración de quitosanasa empleada de 0,0345 µg/mL. En la Figura 42 se muestran los resultados obtenidos para la degradación de la solución de Q11 (1,0%).

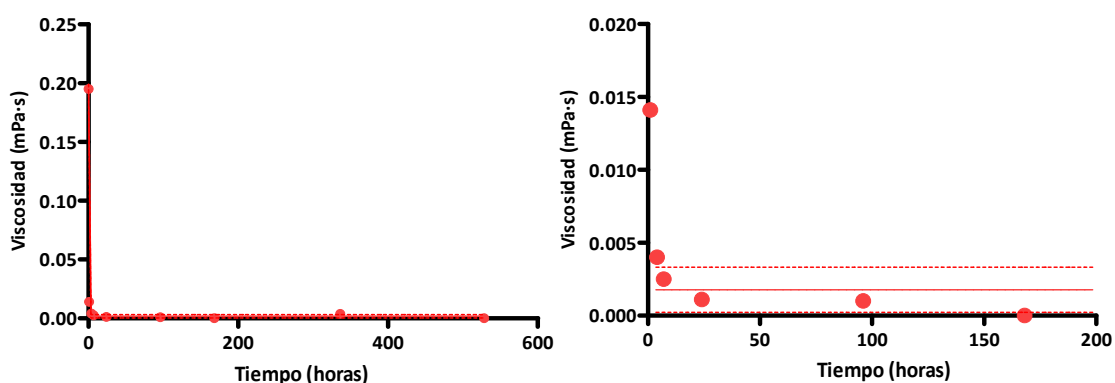


Figura 42. Degradación de la solución de Q11 (1,0%) en medio ácido (tampón AcH/AcONa) y enzima quitosanasa (0,0345 µg/mL) durante 21 días. A la derecha se muestra una ampliación de la misma.

Se puede ver claramente que a tiempo 1 hora se ha producido una disminución de más de un 93% de la viscosidad de la solución a tiempo 0 (0,195 mPa.s, una vez restado el valor de la viscosidad del tampón AcH/AcONa).

El ajuste a una ecuación con caída exponencial de una fase ($r^2 = 0,999$) proporciona un valor de $t_{1/2}$ para este proceso de 0,25 horas, indicándonos la rapidez del proceso de degradación del quitosano en disolución en presencia de una enzima específica para el mismo.

No obstante, en el caso de los filmes de quitosano, es de esperar que el proceso de degradación sea más lento, pues inicialmente el ataque enzimático tiene lugar en la parte del filme en contacto con la solución de quitosanasa. Por otra parte el proceso global también ha de ser más complejo, pues es de esperar que los fragmentos de quitosano obtenidos de esa acción de la quitosanasa sobre el filme pasen a la disolución, aumentando por tanto la viscosidad de ésta, al mismo tiempo que la enzima sigue degradando aquellos fragmentos disueltos, disminuyendo por tanto la viscosidad de la solución.

Este doble fenómeno, aumento de viscosidad debido a la parcial redisolución del filme por el ataque hidrolítico de la quitosanasa, y disminución simultánea de la viscosidad debido a degradación adicional del quitosano en disolución proveniente del ataque enzimático del filme, es el que se observa en los resultados experimentales mostrados en la Figura 43, donde se ha presentado la viscosidad de la solución enzimática en contacto con el filmes en función del tiempo de contacto.

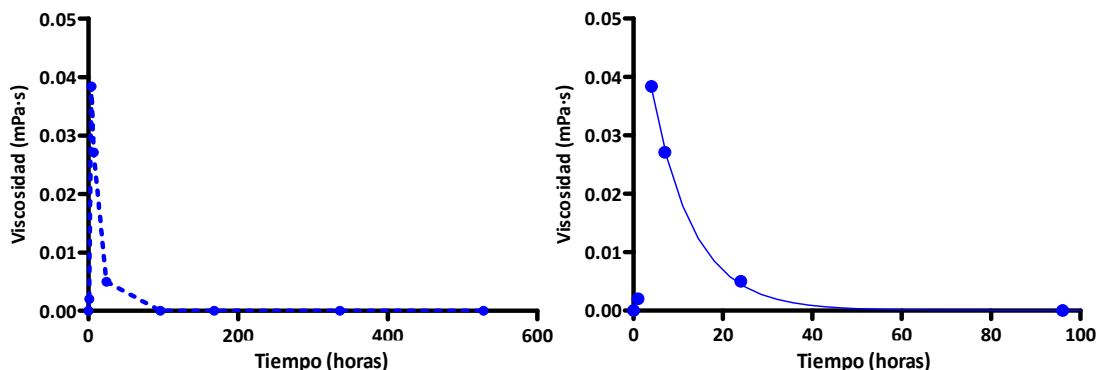


Figura 43. Degradación de los filmes de Q11 (1,0%) en medio ácido (tampón AcH/AcONaNa) y enzima quitosanasa (0,0345 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 21 días. A la derecha se muestra una ampliación de la gráfica.

En la gráfica precedente se ha representado a la izquierda una visión general de los resultados en los tiempos seleccionados. En la gráfica de la derecha se muestra una ampliación de la misma en los tiempos más cortos, junto con el ajuste de mínimos cuadrados no lineales de los datos obtenidos, tras la subida inicial de la viscosidad, a una caída exponencial de una fase. En este caso el valor obtenido de r^2 fue 0,996 y el $t_{1/2}$ correspondiente de 6,46 horas.

Esta diferencia entre los valores de $t_{1/2}$ obtenidos para el quitosano en disolución y en el filme refleja fundamentalmente, como hemos indicado, el tiempo necesario para la redisolución del filme como consecuencia de la acción hidrolítica de la enzima sobre el mismo.

Los hechos descritos hasta ahora para la quitosanasas sirven de referencia orientando el comportamiento a esperar cuando se emplean otras enzimas inespecíficas tipo proteasas. En particular la enzima lisozima, presente en múltiples tejidos a muy bajas concentraciones, es la encargada de hidrolizar el quitosano en condiciones *in vivo* (Muzzarelli, 1997).

Para simular las condiciones *in vivo* se empleó una concentración de enzima lisozima de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (Porstmann *et al.*, 1989) preparada en el mismo tampón AcH/AcONa a pH 5,4. En estos experimentos los filmes de Q11 (1,0%) estuvieron en contacto con dicha solución de enzima, a 37°C y hasta 21 días de incubación.

Desarrollar el experimento durante 21 días implica la necesidad de realizar controles adicionales, ya que el medio de liberación presenta un valor de pH ligeramente ácido (5,4). Dicho valor conlleva una hidrólisis ácida del quitosano que está en disolución al mismo tiempo que una redisolución parcial del filme.

Por tanto en este estudio se han realizado 4 diseños experimentales diferentes para cada uno de los quitosanos incluidos en el mismo. Por una parte, se estudió el proceso de degradación del filme empleando enzima lisozima en tampón AcH/AcONa. Asociado a éste experimento se realizaron otros experimentos adicionales, donde se puso en contacto el filme sólo con la solución de AcH/AcONa de pH 5,4 (sin lisozima) para evaluar sólo el proceso de degradación ácida del mismo.

Paralelamente al estudio de degradación de los filmes, y para obtener los máximos valores de degradación ácida y enzimática, se realizaron experimentos empleando la misma cantidad de polímero (empleada en el filme) pero en solución, bien con tampón solo (degradación ácida) bien con AcH/AcONa y lisozima (degradación ácida y enzimática), durante el mismo periodo de tiempo.

En la Figura 44 se muestran los perfiles de degradación ácida obtenidos para los filmes de Q11 junto con su correspondiente control en disolución (A) y los obtenidos por degradación ácida y enzimática (B) de los mismos.

En ella se puede observar a las 96 horas, la coincidencia de los valores obtenidos para la viscosidad de la disolución en contacto con el filme y la de la solución inicial de Q11, en el caso de la degradación ácida (Figura 44-A) manteniéndose esa coincidencia a tiempos posteriores. Dicha coincidencia de los valores indica la disolución total del filme a este tiempo (96 horas), corroborado además porque a partir de ese instante la evolución de las

viscosidades de ambos sistemas es idéntica.

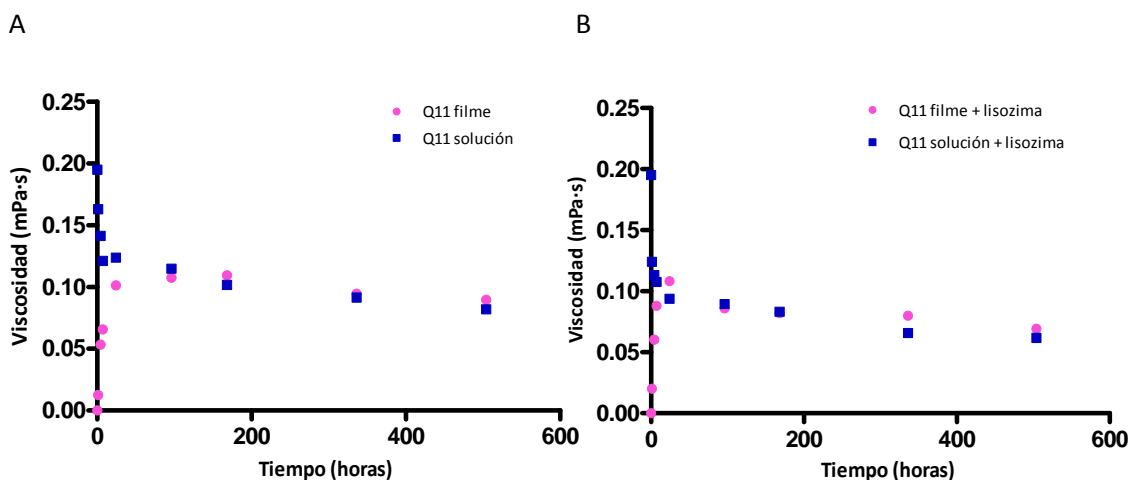


Figura 44. Degradación ácida (A) y degradación ácida y enzimática (B) de la solución y de los filmes del Quitosano Q11 en tampón AcH/AcONa a (pH 5,4, 37 °C y 55 rpm) durante 21 días.

Si comparamos los perfiles de degradación simultánea por medio ácido y lisozima en los sistemas anteriores, la gráfica que se obtiene (Figura 44-B), indica un comportamiento en principio similar, observándose a partir también de las 96 horas la degradación total del filme de quitosano. No obstante, si observamos con mayor detalle se puede detectar que a 48 horas el valor de la viscosidad de la disolución proveniente del filme es mayor que la viscosidad del control, indicando en este caso la disolución total del filme, dos días de adelanto con respecto a lo descrito anteriormente.

Aunque las gráficas son muy parecidas entre sí, los valores de $t_{1/2}$ obtenidos para ambos procesos describen el hecho observado, tanto el de degradación de la solución en medio ácido y ácido con lisozima, como el de redisolución del filme (y posterior degradación) en ambos medios.

Así, el ajuste a una caída exponencial de una fase para el comportamiento de la degradación de la disolución ofrece unos valores de $t_{1/2}$ de 4,54 horas para la degradación ácida exclusiva y de 1,21 horas cuando se ha añadido lisozima al medio, con valores de r^2 para dichos ajustes de 0,877 y 0,831 respectivamente. Si representamos los datos obtenidos junto con la recta de ajuste se observa que ésta está determinada fundamentalmente por la tremenda caída inicial que se observa en los primeros tiempos en la Figura 45.

Se puede conseguir un ajuste mejor considerando la existencia de dos constantes de tiempo, correspondientes a un proceso rápido y uno lento, obteniéndose en este caso valores de r^2 de 0,990 y 0,976 respectivamente. Los valores de $t_{1/2}$ correspondientes a los procesos

rápido y lento pasan a valer 1,375 y 244,9 horas, y para el caso de degradación ácida y enzimática de 0,00865 y 106,1 horas respectivamente. El extraordinario aumento de velocidad en el caso del proceso rápido indica que éste es el afectado fundamentalmente por la acción de la lisozima. Los hechos comentados se ofrecen en la Figura 45-A, donde las líneas continuas representan el ajuste considerando dos constantes de tiempo y las punteadas el ajuste inicial realizado con una sola. Obsérvese como en este primer caso no existe un ajuste adecuado para tiempos superiores a 24 horas.

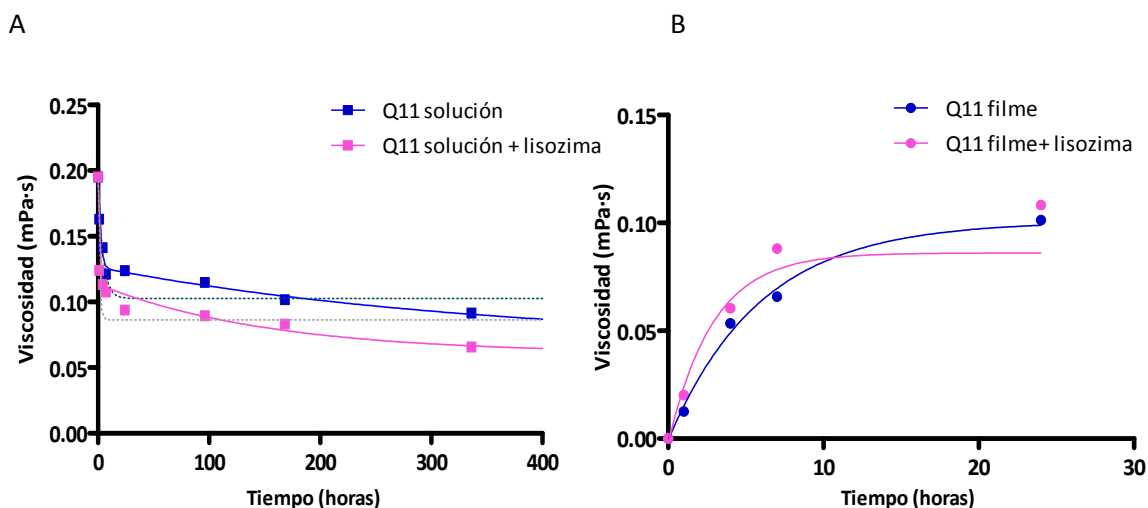


Figura 45. Degradación del quitosano Q11 (1,0%) durante 21 días, A (en solución) y B (filmes) con y sin enzima en presencia de medio ácido (tampón AcH/AcONa, pH 5,4, 37 °C y 55rpm).

La velocidad de disolución-degradación en presencia de lisozima también aumenta en el caso de la disolución puesta en contacto con los filmes de Q11. El ajuste de los datos obtenidos a un proceso exponencial de una sola fase se realizó hasta alcanzar el máximo de viscosidad de la disolución con lisozima, mostrado en la Figura 45-B. Los valores de r^2 de los ajustes son bastante buenos, 0,995 y 0,998 respectivamente para el proceso sólo ácido y ácido/lisozima. Los valores de $t_{1/2}$ obtenidos son de 4,67 y de 3,24 horas respectivamente, poniéndose de manifiesto también el aumento de la velocidad provocado por la presencia de lisozima en el medio de contacto.

Por último se calculó el porcentaje de filme redissuelto en cada una de las condiciones anteriores, considerando el valor de 100% de la viscosidad como la viscosidad que presenta la solución de quitosano sin lisozima, en el mismo punto temporal. Es decir, se empleó la misma cantidad de quitosano utilizada en los filmes pero disuelto directamente en el medio y se comparó con la viscosidad de la solución puesta en contacto con el filme durante el mismo

período de tiempo. Esta representación se ofrece en la Figura 46-A donde se representa conjuntamente ambas condiciones de medio ácido y medio ácido con lisozima.

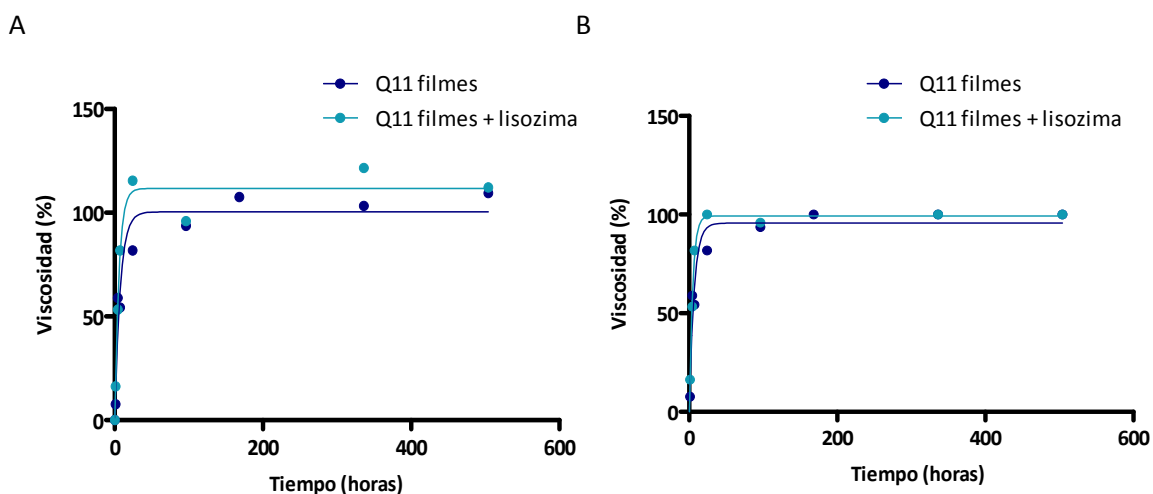


Figura 46. A) Degradación de los filmes de Quitosano Q11 expresada en porcentaje empleando tampón AcH/AcONa (a pH 5,4) con y sin lisozima durante 21 días. B) el ajuste de los mismos al 100%.

En ella se puede observar el hecho de existir numéricamente más de un 100% de redisolución del filme en el caso de que el medio de contacto incluya lisozima. Este hecho se puede justificar debido al diferente alcance de la degradación que a tiempos anteriores presenta el filme de quitosano con respecto al polímero que está en disolución desde el primer momento. El quitosano cuando se disuelve desde el filme no se encuentra degradado en la misma extensión que el quitosano control (totalmente disuelto), y por lo tanto aporta valores de viscosidades superiores que su control.

Para evitar esta aparente anomalía en la gráfica se ha optado por igualar a 100%, en ésta y en las gráficas del mismo tipo correspondientes a otros quitosanos, cualquier valor superior al 100% de disolución mostrando los resultados en la Figura 46-B.

Como se observa ambas gráficas son prácticamente idénticas. El ajuste de las curvas representadas a un proceso exponencial con una sola constante de tiempo produce valores para las mismas muy similares en los dos casos. Así, los valores de $t_{1/2}$ obtenidos para el caso de medio ácido son de 5,18 horas en la primera representación y 4,50 horas en la segunda, mientras que para el caso de medio ácido con lisozima los valores correspondientes son de 3,87 horas y 3,02 horas respectivamente.

Se obtiene el 100% de redisolución en medio ácido a las 91-98 horas y a las 58 horas con la presencia adicional de lisozima, es decir, unos 4 días en el primer caso y algo menos de

dos días y medio en el segundo.

El comportamiento del quitosano anterior, Q11, de un Mw relativamente bajo, contrasta notablemente con el que presenta otro quitosano de alto Mw, como puede ser, por ejemplo, el Q1. En la Figura 47 se puede observar este hecho, donde se han realizado las mismas representaciones de la Figura 44 (A y B), correspondientes al quitosano seleccionado Q1.

En la Figura 47-A se muestra la degradación puramente ácida. Se puede observar que el filme no alcanza la redisolución total en dicho medio, a diferencia de lo mostrado para el quitosano Q11. Por otra parte, se observa que la viscosidad correspondiente a la solución en contacto con el filme no pasa de un cierto valor máximo alcanzado a los 4 días, manteniéndose prácticamente constante en adelante.

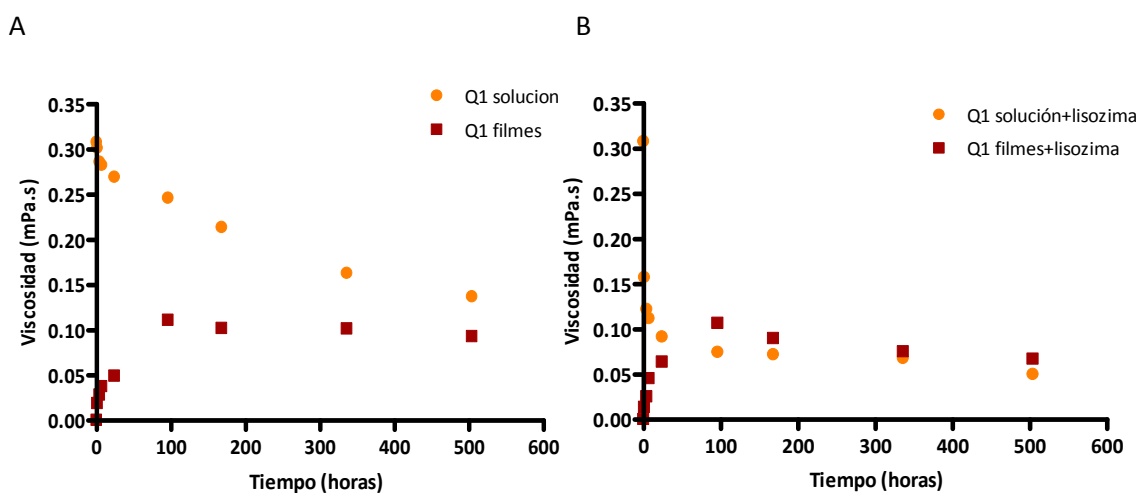


Figura 47. Degradación ácida (A) y degradación ácida y enzimática (B) de la solución y de los filmes del quitosano Q1 (al 1,0% de alto Mw) empleando las mismas condiciones experimentales anteriormente descritas.

En la Figura 47-B, se muestra el comportamiento cuando el medio incluye lisozima. Se puede observar la gran influencia que ejerce la presencia de esta enzima en los procesos de degradación en solución, donde existe una drástica disminución del valor de viscosidad a 1 hora en comparación con medio ácido solamente. Esa influencia también se observa en el medio en contacto con el filme, aunque no de una forma tan llamativa.

En esta gráfica se observa el mismo fenómeno señalado anteriormente para el quitosano Q11, la obtención de valores de viscosidad en el medio en contacto con el filme mayores que los que existen, en el mismo punto temporal para la disolución de quitosano en las mismas condiciones. Como ya se indicó anteriormente, éste hecho no implica que exista mayor cantidad de quitosano, sino que la degradación (tanto ácida como enzimática) no tiene

lugar en la misma extensión que con el quitosano en solución, por lo que la viscosidad de la solución del polímero menos degradado ha de ser mayor.

Una representación similar a la que se hizo en la Figura 45-B para el Q11, donde se compara el comportamiento de los filmes puestos en contacto con tampón ácido y con la adición al mismo de lisozima se ofrece en la Figura 48. Los datos obtenidos se ajustaron a un proceso exponencial, al igual que para el Q11, hasta el máximo de solución en cada caso.

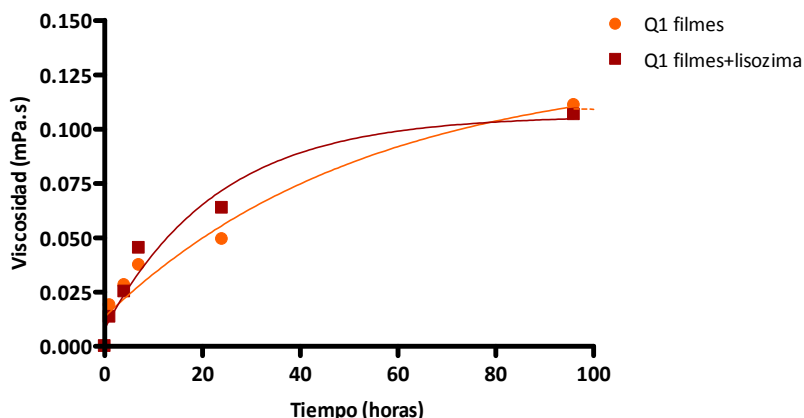


Figura 48. Ajuste a una fase exponencial del proceso de degradación de los filmes de quitosano Q1 (Alto Mw) empleando tampón acético acetato (pH 5,4) con y sin enzima lisozima.

Los ajustes realizados proporcionan unos valores de $t_{1/2}$ de 36,95 horas para el medio sólo y de 15,91 horas cuando se incluye lisozima en el mismo, con unos valores de r^2 de 0,9501 y 0,9643 respectivamente.

Más ilustrativo, aunque íntimamente relacionada con la anterior, es la representación de los porcentajes de disolución del filme que se ofrece a continuación en la Figura 49.

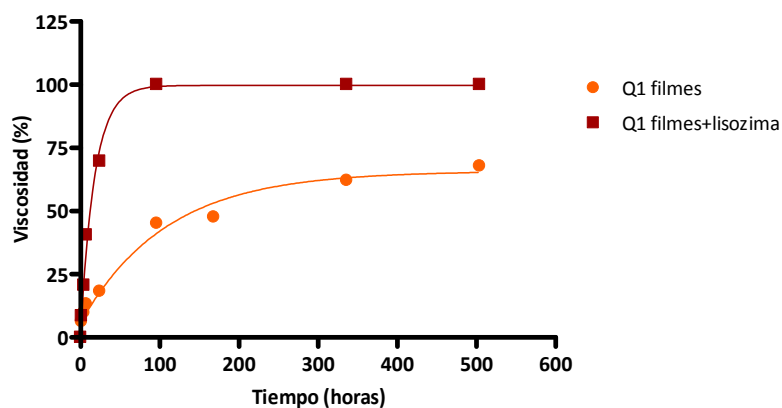


Figura 49. Ajuste a una fase exponencial del proceso de degradación de los filmes de quitosano Q1 (alto Mw) empleando tampón acético acetato (pH 5,4) con y sin enzima lisozima expresado en porcentaje.

En ella se puede observar que a los 21 días no se ha alcanzado la disolución total del filme en medio ácido, siendo la $t_{1/2}$ del mismo de 74,92 horas para el proceso de disolución existente. En cambio en el medio con lisozima sí se observa la disolución total del filme, siendo el proceso además mucho más rápido, con una $t_{1/2}$ de sólo 12,49 horas. Los r^2 obtenidos son 0,980 y 0,994 respectivamente.

Finalmente, a partir de la curva ajustada se obtiene un valor de 210 horas para alcanzar el 100% de disolución del filme, es decir, unos nueve días de contacto son necesarios para la redisolución total del filme.

Un quitosano del grupo de Mw intermedio, por ejemplo el quitosano Q5, muestra un comportamiento en cierta forma muy similar al ya mostrado para el Q11 (véase Figura 50-A y B).

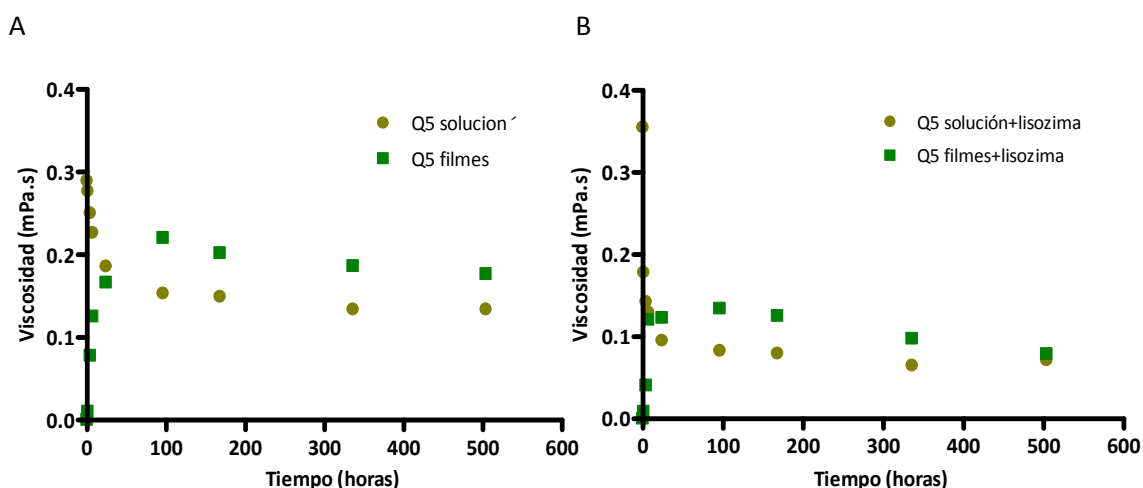


Figura 50. Degradación ácida (A) y degradación ácida y enzimática (B) de la solución y de los filmes del quitosano Q5 de Mw intermedio en las mismas condiciones anteriormente descritas.

Como hemos indicado, existe una redisolución total en ambos casos, hecho también observado para el Q11. Lo más llamativo en este quitosano, en una primera vista, es que parece un proceso bastante más rápido que en los casos descritos anteriormente, no sólo con lisozima sino también en medio ácido sólo. Llama la atención que en ambas gráficas se observan desde tiempos relativamente cortos valores superiores de viscosidad en el medio en contacto con los filmes comparados con los obtenidos directamente de la degradación ácida o ácida y enzimática de las disoluciones. Como se indicó en los casos anteriores este hecho está motivado por la menor accesibilidad de las cadenas de quitosano a ambos agentes (ácido y enzima) cuando están formando parte de un filme que cuando están libres en disolución, provocando que pasen a la solución cadenas de pesos moleculares mayores y, por tanto,

proporcionando una mayor viscosidad al medio.

La velocidad del proceso se observa en la Figura 51, donde de nuevo se ha representado la subida de la viscosidad hasta alcanzar el valor máximo detectado, junto con su ajuste correspondiente.

Se puede observar en la gráfica que la diferencia en cinéticas entre ambos procesos es mucho menor, como lo refleja la menor diferencia entre los valores de $t_{1/2}$ obtenidos de los ajustes. Para el medio ácido es de 5,83 horas y 3,80 horas en presencia de lisozima siendo los valores de r^2 para los ajustes de 0,969 y 0,920 respectivamente.

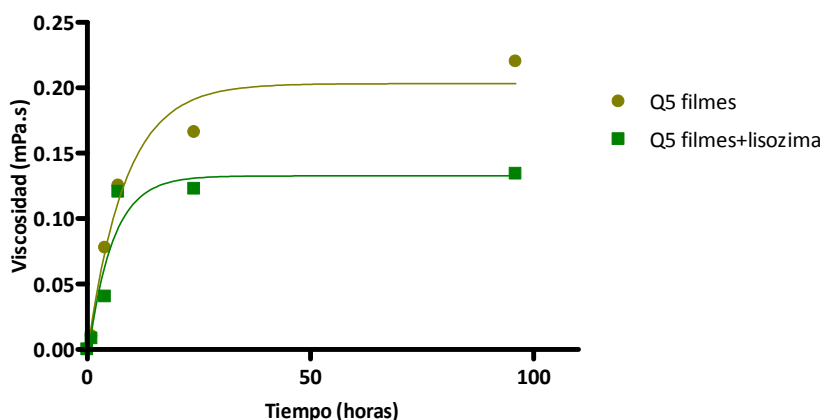


Figura 51. Ajuste a una fase exponencial del proceso de degradación de los filmes de quitosano Q5 (Mw Intermedio) empleando tampón acético acetato (pH 5,4) con y sin enzima lisozima.

La representación de los porcentajes de disolución de los filmes se ofrece en la siguiente Figura 52, que corrobora lo observado a simple vista en las figuras anteriores.

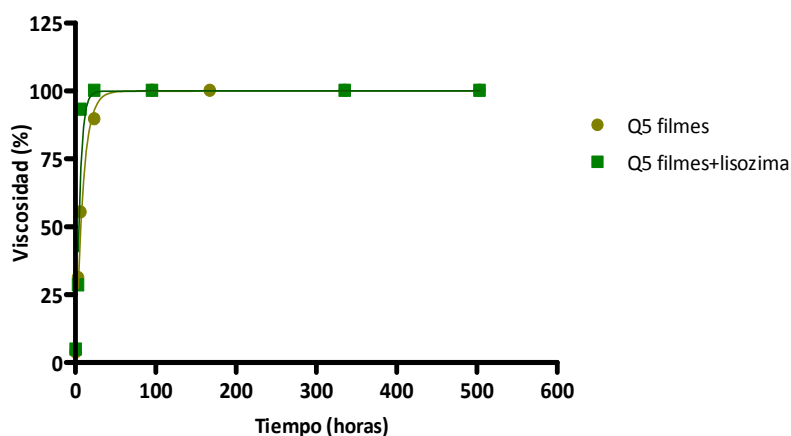


Figura 52. Ajuste a una fase exponencial del proceso de degradación de los filmes de quitosano Q5 (Mw Intermedio) empleando tampón acético acetato (pH 5,4) con y sin enzima lisozima expresado en porcentaje.

Los valores obtenidos de la curva de ajuste del Q5 indican que la disolución total del filme en medio ácido es de unas 80 horas, mientras que este tiempo se reduce a 44 horas en el caso de que exista lisozima. Es decir, la disolución total se producirá en unos 3 días y medio con medio ácido, reduciéndose este tiempo a algo menos de dos días con la inclusión de la lisozima.

La influencia del Mw en el tiempo de degradación en medio ácido es relativamente baja en este caso, pues el tiempo del 100% de disolución del filme de Q11 es unas 98 horas y de 80 horas para el Q5. No obstante es difícil de explicar cómo al aumentar el Mw (de 442 kDa para el Q11 a 617 kDa para el Q5) el tiempo de disolución en medio ácido disminuye siendo más lógica la comparación con el quitosano Q1 (960 kDa) que no alcanza la disolución total en los 21 días de ensayo. Este hecho confirma que no sólo depende del Mw sino también de otros factores adicionales, como la susceptibilidad a la enzima lisozima, la conformación del polímero en solución, la distribución de grupos acetilo e incluso fenómenos de agregación, que influyen en el perfil de degradación, siendo difícil estimar la velocidad de degradación teniendo en cuenta un único factor (Shigemasa *et al.*, 1994; Tomihata y Ikada, 1997).

Más interesante desde un punto de vista práctico, es la tremenda influencia que presenta la lisozima al actuar en ambos quitosanos, Q11 y Q5, así como la semejanza entre los valores de tiempo de redisolución total obtenidos, dos días y medio para el Q11 y algo menos de dos días para el Q5, mientras que el Q1 presenta en este caso un valor de disolución total en estas condiciones de unos nueve días. Tal vez la hidrólisis adicional producida por la lisozima disminuya las interacciones entre las cadenas en disolución, relacionando de forma más directa los tiempos de disolución obtenidos a partir de medidas de viscosidad con el Mw del quitosano empleado.

Las diferencias encontradas entre los representantes elegidos para cada uno de los grupos de Mw considerados, nos llevó a extender estos análisis a todos los quitosanos incluidos en este estudio, con objeto de poder establecer comparaciones entre los mismos.

En este caso nos hemos centrado en la evaluación de las cinéticas correspondientes a los porcentajes de redisolución-degradación en medio ácido o ácido y enzimático de los filmes (porcentaje calculado, como hemos indicado anteriormente al hablar del Q11, con respecto a los valores existentes en el mismo punto temporal para los diferentes quitosanos en disolución).

Los ajustes realizados son muy similares a los ya mostrados para los ejemplos realizados anteriormente. A través del programa Prism 5, se pudo contrastar estadísticamente si algunos parámetros relevantes (en nuestro caso Y_0 , k y el Plateau alcanzado) pueden ser comunes a los diferentes conjuntos de datos ofrecidos. Es decir, si es posible considerar

diferentes quitosanos como equivalentes en cuanto a este comportamiento o no. Para realizar este estudio se optó por analizar los datos experimentales obtenidos sin forzar a presentar como máximo de disolución el 100%.

Los resultados de este tipo de análisis son diferentes para el comportamiento de los filmes sometidos sólo a degradación ácida con respecto a los obtenidos cuando la degradación es ácida y enzimática simultáneamente.

En la Figura 53 se ofrece el ajuste obtenido para la degradación ácida de los diferentes tipos de quitosanos, agrupados en dos grandes grupos: alto Mw y Mw bajo e intermedio.

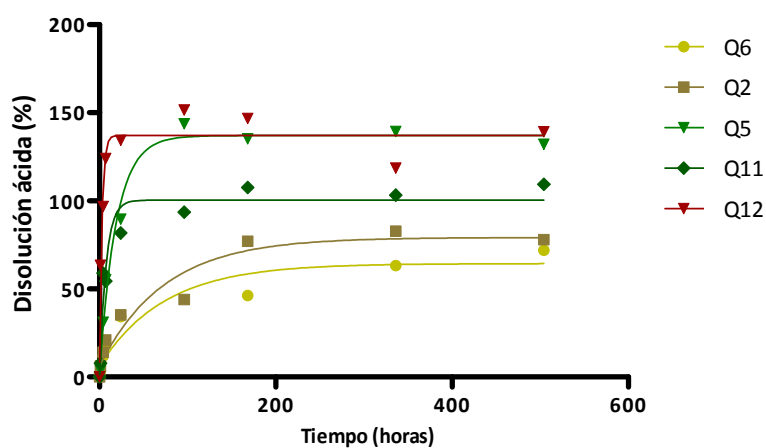


Figura 53. Degradación ácida de los filmes de quitosano (1,0% p/v) durante 21 días de ensayo mostrándose ejemplos de los diferentes grupos de quitosanos en función del Mw.

Para el caso de alto Mw los ajustes realizados indican que todos los perfiles de redisolución pueden compartir los mismos valores de Y_0 y lo que es más importante, k , la constante de velocidad del proceso. Tal vez este hecho refleja el que no se puede distinguir entre ellos dada la elevada viscosidad de las disoluciones obtenidas.

Es llamativa, por otra parte, la diferencia existente entre los niveles máximos de redisolución, que es de sólo un 50-60% aproximadamente para este grupo de quitosanos. En la gráfica se muestra como representante de este comportamiento el Q6.

Si se observan los quitosanos pertenecientes a los grupos de Mw bajos e intermedios, la comparación entre los ajustes obtenidos no permite realizar ningún tipo de agrupación como ocurría anteriormente. Cada perfil indica unas cinéticas de redisolución en medio ácido diferentes para cada uno de los quitosanos considerados.

Destaca el comportamiento del quitosano Q12, de alto DD, en comparación con el Q11, de Mw prácticamente idéntico pero con menor DD. El quitosano Q12 presenta una

cinética extraordinariamente rápida, debido al mayor número de grupos amino presentes en el mismo, cuya protonación facilita el proceso de disolución en medio ácido.

Por otra parte, los niveles de disolución alcanzados en estos quitosanos son superiores con respecto a los descritos para los de alto Mw, pues oscilan entre el 75 y el 150%. Los valores inferiores al 100% indican, como hemos señalado anteriormente, y como se observó en la Figura 47-A referente al Q1, una redisolución incompleta del filme, mientras que valores muy superiores al 100% reflejan el desfase existente entre el proceso de redisolución y el proceso de degradación ácida (véase la Figura 50-A del Q5). En este sentido los filmes de los quitosanos Q9 y Q11 son los únicos que muestran un comportamiento similar en cuanto a la degradación ácida al existente en la degradación en disolución.

Si comparamos el comportamiento anterior con el que presentan los filmes sometidos simultáneamente a degradación ácida y enzimática, la situación que se observa en la Figura 54 es muy diferente.

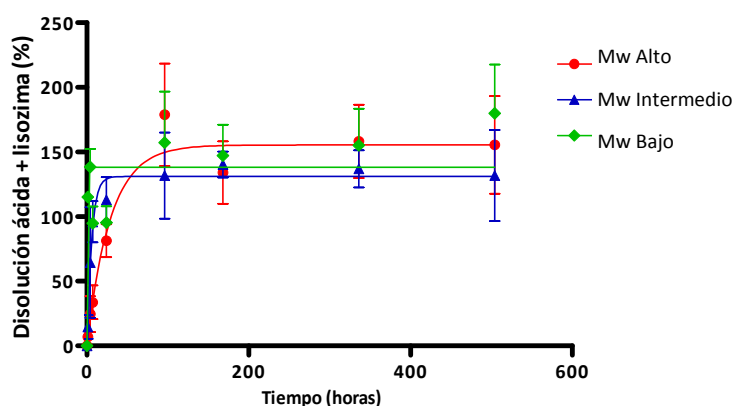


Figura 54. Degradación ácida y enzimática de los filmes de quitosanos (1,0%) agrupados en función de su Mw durante 21 días de ensayo.

En ella, al igual que antes, se puede agrupar el comportamiento de los filmes de alto Mw, siendo los datos compatibles con unos mismos parámetros para el ajuste independientemente del quitosano.

Por otra parte, los quitosanos de Mw bajo e intermedio, que presentaban comportamientos diferentes cuando sólo estaban sometidos a degradación ácida, ahora en presencia de lisozima, el test de igualdad de parámetros nos indica que todos los perfiles de redisolución-degradación se pueden ajustar con los mismos valores, independientemente del quitosano seleccionado.

Como excepción destaca el comportamiento del Q12, presentando parámetros muy diferentes de todos los demás en estas condiciones, al igual que pasaba en la disolución exclusivamente ácida. El Q12 posee un valor de $t_{1/2}$ muy bajo, provocado por la redisolución muy rápida debida al mayor número de aminas protonadas en comparación con el resto de quitosanos de su grupo, es decir en relación a su elevado DD. Como contrapunto, el Q12 mostró unos resultados no esperados, pues la enzima lisozima pudo degradar de forma muy rápida dicho filme ($t_{1/2}$ muy bajo) sabiendo que quitosanos de elevado DD no son sustrato de la enzima lisozima. Este fenómeno contrasta aparentemente con el hecho descrito en la literatura, donde quitosanos con menor DD son más susceptibles al ataque enzimático (Tomihata y Ikada, 1997; Shigemasa *et al.*, 1994). Sin embargo, hay que tener en cuenta, que la disolución del filme de Q12 tiene lugar muy rápidamente en medio ácido, facilitando así el ataque enzimático.

Se puede apreciar la existencia de un aumento en la constante de velocidad del proceso para todos los quitosanos estudiados, con respecto a los valores obtenidos para los porcentajes de redisolución en medio ácido, cualquiera que sea su grupo. Los filmes de quitosanos de alto Mw en medio ácido mostraron un $t_{1/2}$ de 35,70 horas mientras que en presencia de lisozima en dicho medio presentaron valores de $t_{1/2}$ de 20,25 horas. Para los quitosanos de Mw relativamente bajo se encontraron valores de $t_{1/2}$ comprendidos entre 5 y 13 horas, dependiendo del quitosano concreto, a un valor común para ellos de $t_{1/2}$ de 4 horas.

Además se realizaron experimentos para evaluar la redisolución del filme a un solo punto temporal (24 horas) usando diferentes concentraciones de la solución de quitosano para su preparación. Este experimento se realizó solamente con algunos de los quitosanos de cada uno de los grupos de Mw, seleccionándose como quitosanos pertenecientes al grupo de alto Mw Q1, Q6 y Q8 (Figura 55-A), y dentro del grupo de Mw bajo-intermedio a los quitosanos Q2, Q5 y Q9 (Figura 55-B). Como en el análisis anterior el quitosano Q12, presenta un comportamiento diferente al resto de quitosanos no se incluyó en ninguno de los grupos.

En todos los casos se ajustan los comportamientos observados a una relación lineal entre la viscosidad de la disolución en contacto con los filmes a las 24 horas, con la concentración de la disolución de quitosano empleada para su formación, estando los valores de r^2 obtenidos entre 0,88 y 0,95 para el grupo de alto Mw, y del orden de 0,98-0,99 para todos los del grupo de Mw bajo e intermedio.

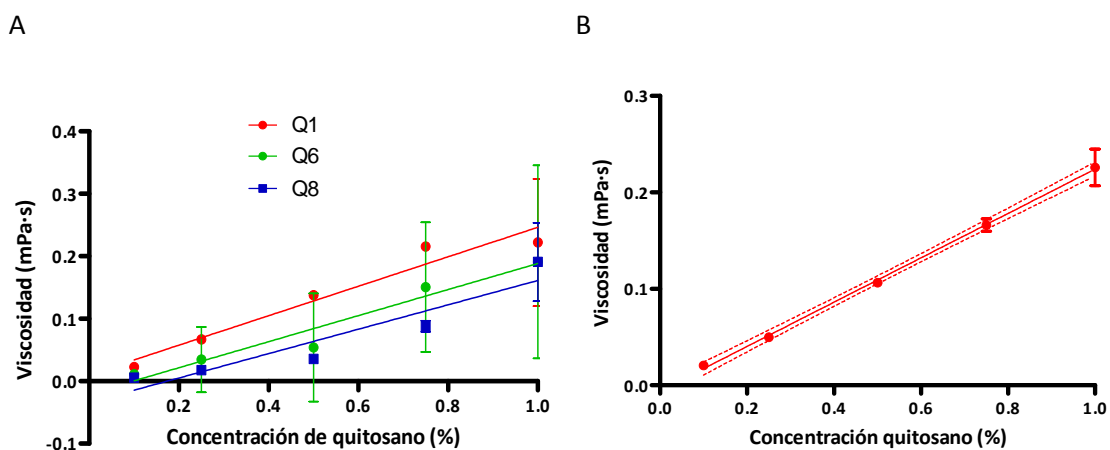


Figura 55. A) Degradación de los filmes de quitosano preparados a partir de diferentes concentraciones de polímero a las 24 horas en tampón acético acetato en agitación a 37 °C. B) Ajuste obtenido de los quitosanos de Mw bajo e intermedio (Q2, Q5 y Q9).

En ambos casos se realizó un test de igualdad de pendientes entre las distintas rectas ajustadas, obteniéndose como resultado que no existen diferencias significativas entre las pendientes de un mismo grupo, pudiéndose ajustar todas las rectas con valor de pendiente común, 0,194 para el grupo de alto Mw y de 0,230 para los de Mw bajo e intermedio.

No obstante, en el primer caso, existen diferencias muy significativas entre las ordenadas en el origen de los ajustes de los diferentes quitosanos, por lo que no se puede obtener una recta común que los describa de una forma global. Mientras que en el caso de los quitosanos de bajo Mw las ordenadas en el origen no presentan diferencias significativas entre ellas, pudiéndose ajustar el conjunto de todos los datos por una recta de ecuación:

$$y = (-0,005669 \pm 0,002447) + (0,2298 \pm 0,003985) X$$

cuyo valor de r^2 es 0,999, ajuste conjunto que se ofrece en la Figura 55-B.

Como una corroboración visual final de los resultados presentados, se tomaron fotografías de los recipientes donde se realizaron los experimentos de degradación con filmes. Al final de cada tiempo de incubación dichos recipientes mostraron la presencia de restos de filmes de forma heterogénea.

En algunos casos la presencia de filmes es prácticamente inexistente, siendo imposible reconocer ningún resto de polímero adherido a las paredes de los botes de forma visual (como ejemplo se muestra el Q11 y con él, el Q4, Q9 o Q12) mientras que en otros casos, se puede observar con suma facilidad grandes cantidades de filme en las paredes del recipiente a distintos puntos temporales, siendo este el caso de los quitosanos Q1, Q3 e incluso Q10 (Véase

Figura 56).

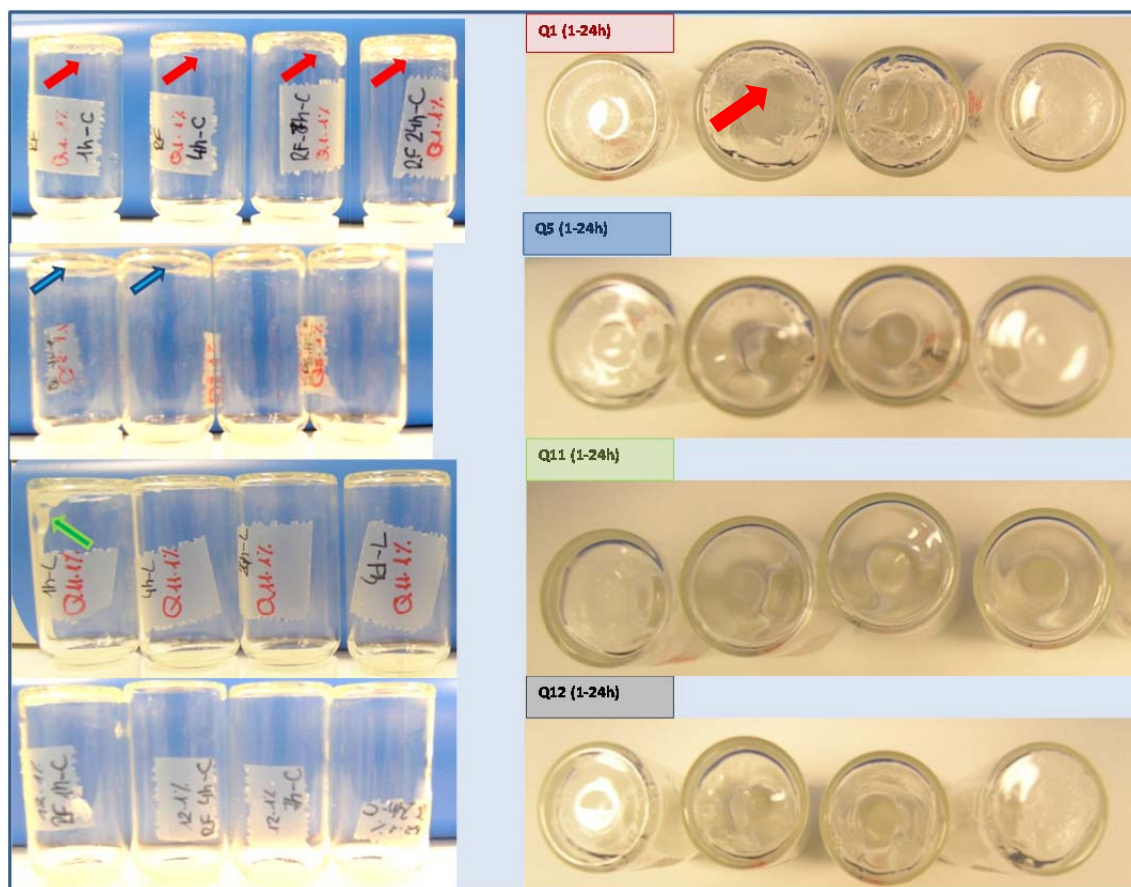


Figura 56. Fotografías de los recipientes correspondientes al ensayo de degradación ácida y enzimática una vez finalizado el tiempo de incubación (se muestran solo a modo de ejemplo las primeras 24 horas). En ella se aprecian restos de filmes de forma heterogénea en función del tipo de quitosano y del punto temporal.

Una evaluación más cuantitativa sobre la presencia de los restos de filmes se llevó a cabo mediante la completa disolución de los mismos en medio ácido (24 horas en ácido acético 50 mM (pH 3, a 37 °C) y la evaluación de la viscosidad de la solución resultante.

En la Figura 57 se ofrece una gráfica conjunta del contenido remanente de los filmes para representantes de cada uno de los grupos anteriormente mencionados, complementando la información puramente visual previa.

Como se puede apreciar, la viscosidad de la disolución de quitosanos de Mw elevado (Q7) es superior a la existente en el resto de quitosanos, corroborando la descripción de los restos de los filmes de forma visual (mostrados en la Figura 56).

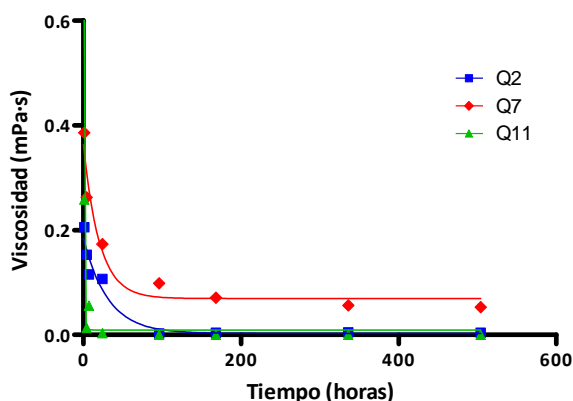


Figura 57. Representación de la viscosidad de las disoluciones obtenidas de los restos de los filmes que proceden del ensayo de degradación ácida y enzimática. Se muestran tres quitosanos como representantes de cada grupo.

Por último se realizaron experiencias de degradación en otros medios, PBS (pH 7,4) simulando las condiciones existentes *in vivo* una vez pasadas las primeras etapas de la respuesta tisular en una herida.

Los resultados obtenidos indicaron en todos los casos la escasa o nula degradación de los filmes en estas condiciones en los tiempos estudiados, como se puede observar en la Figura 58-A mostrada a continuación para un quitosano de degradación-redisolución muy rápida en condiciones ácidas (Q12). En ella se puede observar que las variaciones existentes en la degradación en PBS con y sin enzima son tremendamente pequeñas (basta con observar la escala del eje Y correspondiente).

En la Figura 58-B se observa que prácticamente no existe variación en la viscosidad obtenida tras la redisolución en medio ácido de los filmes remanentes, indicando ambos hechos, la ausencia de degradación de los filmes de forma apreciable en los intervalos de tiempo seleccionados.

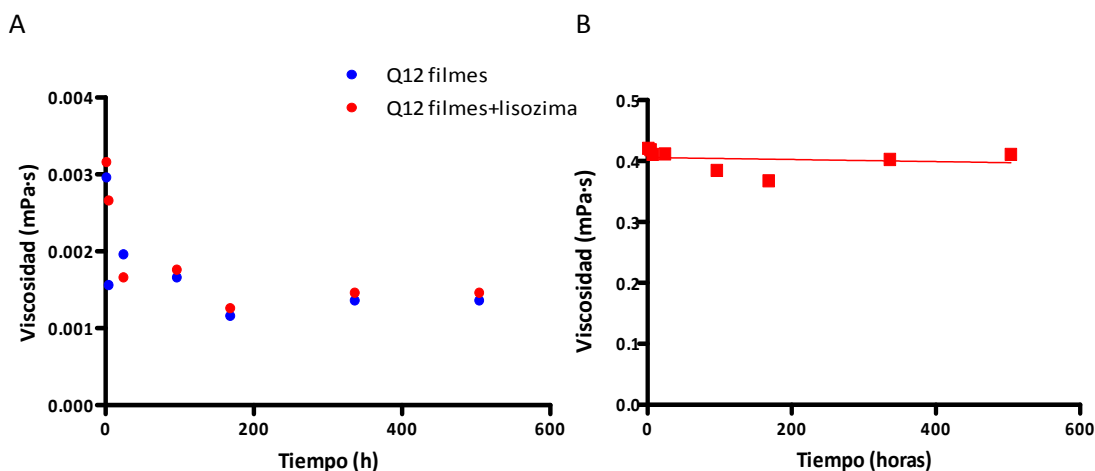


Figura 58. Representación de la viscosidad de la disolución en contacto con filmes de quitosano Q12 (1,0%) en tampón fosfato (PBS, pH 7,4 a 37 °C) durante los 21 días de ensayo.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores donde describen la escasa o nula degradación de filmes, microesferas, e incluso de recubrimientos de quitosano en implantes de titanio, a pH neutro (PBS) con y sin enzima lisozima (Dhanícula *et al.*, 2004; Chellat *et al.*, 2000; Bumgardner *et al.*, 2003b).

Como resumen de lo expuesto anteriormente, se observó que los quitosanos de alto Mw mostraron la misma velocidad de degradación en medio ácido (pH 5,4). Los perfiles de degradación de los quitosanos de Mw bajo e intermedio fueron característicos de cada quitosano, sin poderse agrupar entre ellos. Destaca el Q12 con elevado DD, el cual presenta la cinética de redisolución del filme más rápida en medio pH 5,4.

Los quitosanos de Mw bajo e intermedio alcanzaron niveles de redisolución finales mayores en medio ácido que los de Mw elevado, llegando en muchos casos al 100% de redisolución (8-9 días). Mientras que quitosanos de Mw elevado no llegaron a la completa redisolución, coincidiendo con la presencia de restos de filmes a los 21 días de ensayo.

En presencia de lisozima, se incrementa notablemente la velocidad de disolución en todos los casos, pudiendo agrupar todos los quitosanos de Mw bajo e intermedio en un solo perfil, destacando de nuevo el comportamiento del Q12, como quitosano diferente a todos ellos.

Se ha observado la escasa o nula degradación del polímero a pH neutro, con o sin enzima, incluso en el quitosano con mayor DD, siendo estable y duradero en estas condiciones.

Desde un punto de vista práctico se puede señalar que esta técnica nos permite seleccionar un tipo de quitosano basándonos en el Mw y el DD del mismo en función del tiempo de residencia que se pretenda en el organismo.

4. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS FILMES: ESTUDIOS *IN VITRO*

En este apartado se evaluará como afectan las características fisicoquímicas del quitosano y de sus filmes a las propiedades de adherencia, proliferación y diferenciación celular sobre los mismos, muy importantes para los usos propuestos en TE para este tipo de recubrimiento.

En la actualidad se disponen de numerosas técnicas para determinar la proliferación celular, basándose la gran mayoría de ellas en una medida indirecta de la misma, determinando parámetros relacionados con la cantidad de células totales. Un ejemplo es la cuantificación de las proteínas totales presentes en el cultivo o la determinación de actividades metabólicas específicas. A pesar de ser, como hemos dicho, técnicas indirectas, son de uso frecuente en investigación ya que se trata de métodos rápidos, sencillos y reproducibles.

Como línea celular modelo para el desarrollo experimental se ha empleado la línea premitótica de ratón C2C12, obtenida de la ATCC, y empleada de forma rutinaria en nuestro laboratorio ya que es capaz de evolucionar hacia linaje osteoblástico, expresando marcadores óseos como la ALP y osteocalcina, en presencia de rhBMP-2.

Como método de ensayo inicial para la evaluación de la proliferación celular se empleó el método de Bradford (Bradford, 1976). Esta técnica cuantifica la cantidad de proteínas totales, basándose para ello en la afinidad del colorante azul de Coomassie G250 por aminoácidos básicos y aromáticos presentes en las proteínas (especialmente Arginina, Triptófano, Fenilalanina y Prolina).

La siembra celular inicial fue de 10.000 células/cm² y se evaluó el número de células presentes tras 4 días de cultivo. En todos los casos se emplearon como controles positivos células sembradas directamente sobre los pocillos de la placa de cultivo comercial tratadas para la adherencia celular (PC), es decir, sin recubrimiento de quitosano. Como blancos para la substracción de la señal proporcionada por los filmes de quitosano se emplearon controles de las diferentes superficies estudiadas sin células.

Los resultados obtenidos de la proliferación celular se presentan en la Figura 59 expresados como porcentajes respecto a los valores alcanzados en la superficie control de plástico (PC). La expresión en porcentaje nos permite una comparación más fácil entre resultados obtenidos en experimentos diferentes al permitir independizarnos del pase celular.

En la Figura 59-A se muestra los resultados de todos los quitosanos preparados a una sola concentración de polímero en el filme (0,25%). Todos ellos mostraron valores inferiores al plástico control (100%, equivalente a 8,65 µg de proteínas para 10 µl del extracto de lisis) destacando el Q4 y Q5 como quitosanos con mayores niveles de porcentaje de proteínas (55-60%).

El ANOVA de una vía realizado sobre los datos obtenidos mostró diferencias muy significativas de todos ellos con respecto al PC ($P < 0,001$). A través de un post test de Tukey comparando los datos de todos los quitosanos entre sí, se obtuvo como primer resultado que sólo los quitosanos Q1, Q8, Q9 y Q10 presentan diferencias con los valores obtenidos para el Q4 o el Q5 (o con ambos), con valores de $P < 0,01$ o $P < 0,05$; dependiendo de la comparación establecida. El resultado del test es, sin embargo, de no significativo ($P > 0,05$) para cualquier otra comparación realizada.

La Figura 59-B muestra los resultados obtenidos para un ensayo similar empleando la misma técnica, en el que se han seleccionado algunos de los quitosanos testados previamente y en la que se ha variado, adicionalmente, la concentración de la solución de quitosano empleada para la realización del filme.

Se puede observar un comportamiento similar en cuanto al porcentaje máximo de proliferación con respecto al control de plástico, entre el 60-70% para el Q4 y Q11 en este experimento.

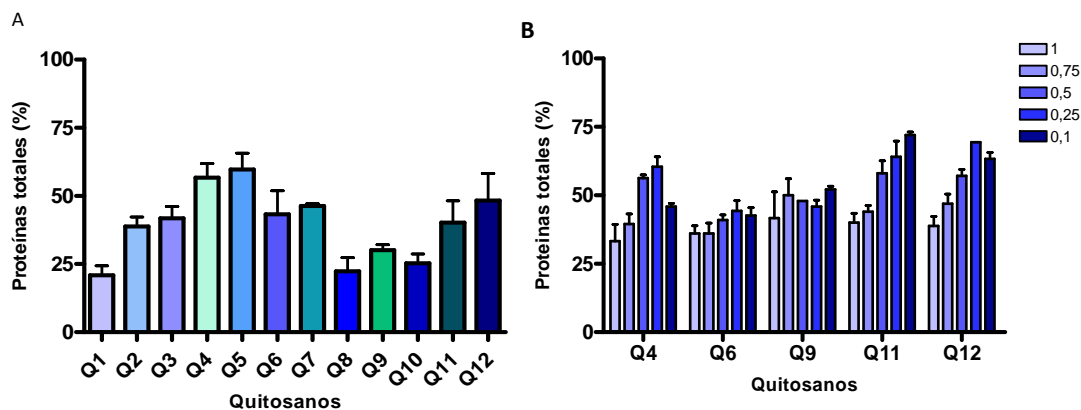


Figura 59. Determinación de la proliferación celular sobre los filmes de quitosano mediante ensayo de Bradford. A) Todos los filmes preparados a una sola concentración (0,25%) y B) Selección de quitosanos representativos de los grupos de Mw a diferentes concentraciones (%) de polímero en el filme.

Un ANOVA de dos vías indicó que ambas variables (tipo de quitosano y concentración), producen diferencias extremadamente significativas ($P < 0,0001$) en los resultados obtenidos presentando una interacción muy significativa ($P < 0,001$) entre ambas variables.

Analizando en profundidad la influencia de la concentración dentro de cada quitosano, mediante un post test de Bonferroni, destacamos varios hechos interesantes. En primer lugar se observa una tendencia para la mayoría de los quitosanos con la concentración, apreciándose un aumento en la proliferación celular al disminuir la concentración de quitosano en el filme.

Este comportamiento no se confirma plenamente desde el punto de vista estadístico, en el sentido de que, por ejemplo, para cualquier quitosano analizado no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ese Q al 1,0% y al 0,75%, entre el 0,75% y el 0,5%, entre el 0,5% y el 0,25% ni, finalmente, entre el 0,25% y el 0,1% de concentración.

En cambio, las diferencias surgen cuando se comparan concentraciones de filmes más alejadas entre sí, aumentando normalmente el nivel de significación cuanto mayor sea la diferencia de concentraciones.

Como ejemplo nombraremos simplemente que tanto el Q4, como el Q11 y Q12, proporcionaron diferencias muy significativas al comparar los resultados obtenidos al 1,0% con los del 0,25%, variando el nivel de significación con el quitosano concreto de que se trate ($P < 0,001$ para el Q4, $P < 0,01$ para el Q11 y $P < 0,0001$ para el Q12).

En cambio, algunos quitosanos, como el Q6 y el Q9, no mostraron esa tendencia, sino que la concentración parece no afectar a los resultados obtenidos, alcanzándose valores muy similares en todas las concentraciones empleadas.

Un análisis de dos vías intercambiando filas por columnas, es decir analizando la matriz transpuesta de los datos resumidos, los resultados globales, como es lógico, no cambian pues se trata de los mismos datos, pero las comparaciones en los post test se centran en este caso en los quitosanos y no en las concentraciones.

El resultado obtenido muestra que no existen diferencias significativas entre los diferentes quitosanos salvo para valores bajos de concentración. Es decir, sólo aparecen diferencias entre algunos quitosanos para valores de concentración del filme del 0,25% o el 0,1%, destacando en este sentido los quitosanos Q11 y Q12.

Debido a la fuerte interacción entre variables, tipo de quitosanos y concentración de polímero en el filme, en ambos ANOVAS de dos vías, se hace muy difícil realizar conexiones claras entre las diferencias fisicoquímicas de cada muestra y el porcentaje de proteínas totales alcanzado.

El ensayo de Bradford es una técnica de uso frecuente en trabajos que emplean proteínas morfogenéticas óseas (López-Lacomba *et al.*, 2006) para poder cuantificar la actividad de las mismas sobre cultivos celulares, razón por la que aparecerá posteriormente al abordar su uso en la diferenciación celular sobre filmes de quitosano.

El procedimiento del ensayo puede interferir en los resultados finales (excesivos lavados con pérdida de células, o la adsorción por parte del filme de grandes cantidades de proteínas procedentes del medio de cultivo completo) que conducen a la obtención de valores de desviación importantes, que enmascaran adicionalmente un sistema ya de por sí complejo.

Debido a ello se decidió seleccionar otro método de ensayo para determinar la proliferación celular, cambiando el Bradford empleado por otra metodología basada en la actividad metabólica de células. La técnica de elección fue el ensayo de MTS, siendo este un ensayo que permite cuantificar también de forma indirecta la proliferación celular mediante la determinación de la actividad reductora de las células. El ensayo de MTS (variante del ensayo del MTT) consiste en la determinación una enzima mitocondrial, la succinato deshidrogenasa (Hamid *et al.*, 2004) sobre una sal de tetrazolio, produciéndose cristales de formazán que en el caso del MTS son solubles en el medio de cultivo, determinándose la concentración mediante la lectura de Absorbancia de la disolución a 460 nm.

En la Figura 60 se muestran los resultados obtenidos mediante el ensayo del MTS empleando las mismas condiciones experimentales que para el ensayo de Bradford anteriormente mostrado. En la imagen A, se presentan los resultados obtenidos para todos los

quitosanos a una concentración (0,25%) y en B, empleando diferentes concentraciones para la obtención del filme de quitosanos seleccionados.

Se puede observar un comportamiento similar al ensayo de Bradford en la Figura 60-A, alcanzándose sólo valores de actividad metabólica de un 60-70 % de los conseguidos con el PC incluido en el ensayo (100%) y destacándose de nuevo los quitosanos Q4, Q5, Q11 y Q12, como los filmes que favorecen mayores niveles de actividad metabólica, incluyendo en dicho grupo también al Q9.

El ANOVA de una vía indicó nuevamente la existencia de diferencias extremadamente significativas entre los quitosanos preparados al 0,25%, ($P < 0,0001$). Un post test de Tukey identificó las principales diferencias, que de forma general se centran en los quitosanos Q1, Q2, Q3, Q8 y Q10 con respecto a los quitosanos Q4, Q5, Q9, Q11 y Q12 con un $P < 0,05$ o $P < 0,01$ para la mayoría, llegando en algunas ocasiones hasta niveles de significación $P < 0,001$. Si tenemos en cuenta los Mw de los quitosanos presentes en ambos grupos, parece que existe un agrupamiento entre quitosanos de alto Mw, por una parte, y quitosanos de Mw bajos por otra, no existiendo prácticamente diferencias significativas entre los quitosanos pertenecientes a un mismo grupo. Finalmente existe un tercer grupo de quitosanos, constituido por los quitosanos Q6 y Q7, que no presentan diferencias significativas con algunos de los quitosanos incluidos en los grupos anteriores.

Estos resultados parecen perfilar al Mw como un factor a tener en cuenta indicando que aquellos quitosanos de Mw bajos o muy bajos presentan, en conjunto, niveles de proliferación en los filmes superiores a los obtenidos a partir de Mw elevados. Además se aprecia cierto efecto del DD de los quitosanos pues coincide que aquellos con mayores niveles de proliferación presentan DD superiores.

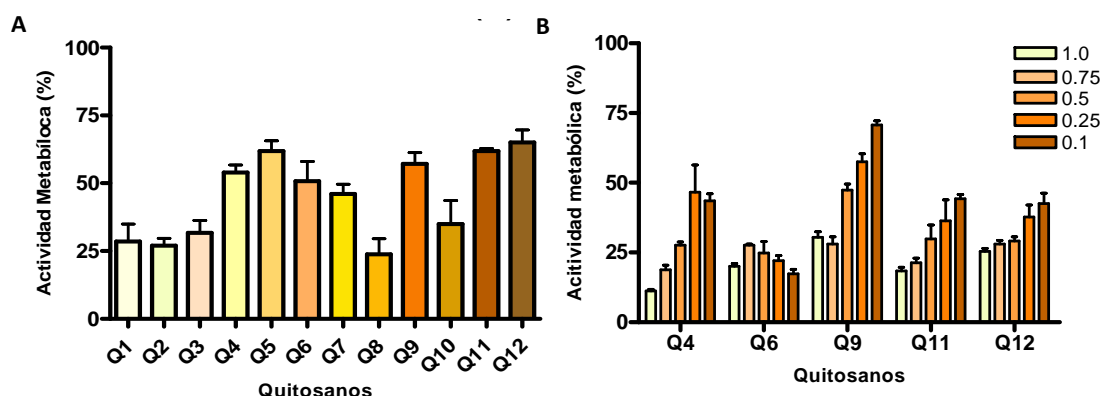


Figura 60. Determinación de la proliferación celular sobre filmes de quitosano mediante ensayo de MTS. A) Todos los filmes preparados a una sola concentración (0,25%) y B) diferentes quitosanos representativos de los grupos de Mw a diferentes concentraciones (%) de polímero en el filme.

En la misma Figura 60 la gráfica B reúne los resultados obtenidos empleando diferentes concentraciones de polímero en el filme de los quitosanos Q4, Q6, Q9, Q11 y Q12. El ANOVA de dos vías realizado indica, de nuevo, la existencia de variaciones extremadamente significativas ($P < 0,0001$) producidas por las dos variables consideradas (tipo de quitosano y concentración), existiendo asimismo una interacción fuerte entre ambas variables ($P < 0,0001$).

El post test de Bonferroni aplicado a los datos anteriores nos permite evaluar la influencia de la concentración dentro de cada quitosano. De nuevo destaca el Q6, donde los resultados de dicho test indican que, la proliferación celular no se afecta por la concentración del quitosano, obteniéndose siempre un $P > 0,05$ al comparar los valores obtenidos en las distintas concentraciones de Q6. En el resto de quitosanos sí se encuentran diferencias significativas con la concentración, destacando 0,5% como punto crítico ya que, por encima de ella, no existen diferencias significativas entre el 1,0% y el 0,75% para ninguno de los quitosanos. En cambio, por debajo de ella, la comparación entre los valores obtenidos al 0,25% y al 0,1% para cada quitosano, produce un valor de $P > 0,05$. Es decir, parece que por debajo de concentraciones del 0,75% empieza un aumento, más o menos gradual, de la proliferación celular a medida que disminuye la concentración de polímero en la solución empleada en la formación del filme, hecho que se intuye en la Figura 60-B mostrada.

El ANOVA de 2 vías realizado ahora sobre la traspuesta de los datos anteriores indica que el comportamiento de los quitosanos Q4, Q11 y Q12 es el mismo a cualquiera de las concentraciones estudiadas, con un valor de $P > 0,05$ en todos los casos. Por otra parte, se obtiene también la no significación entre cualquier par de quitosanos estudiados para las concentraciones del 1,0% y el 0,75% y es sólo a concentraciones inferiores al 0,5% donde comienzan las diferencias significativas, de mayor o menor intensidad, dependiendo de la pareja concreta de quitosanos que se testee.

Parece que, a altas concentraciones de quitosano, todos presentan la misma actividad metabólica independientemente del tipo de quitosano de que se trate. A concentraciones inferiores, se distingue un aumento de la proliferación, para los quitosanos de menor Mw y DD elevado, al disminuir la concentración de quitosano en el filme, de forma que a concentraciones del 0,1% se encuentran los valores máximos de la misma.

Dentro del grupo de quitosanos en los que la proliferación celular aumenta de forma inversa a la concentración del mismo, se diferencia un conjunto de ellos, Q4, Q11 y Q12, que tienen exactamente el mismo comportamiento, dentro de las limitaciones de la técnica y del nivel de confianza establecido. La selección de esta técnica mejora el análisis de los datos al eliminar tanto la etapa de manipulación excesiva del Bradford, como al disminuir los niveles del fondo con respecto a las medidas experimentales realizadas.

A pesar de la mejora conseguida con el ensayo de MTS, éste continúa presentando algunos inconvenientes en común con el Bradford. El primero de ellos es que se trata de un ensayo destructivo, es decir las células mueren en la realización del mismo. Como segundo inconveniente, se presenta un ensayo basado en medidas de absorbancias, con la falta de sensibilidad inherente a esta técnica cuando la concentración del metabolito es muy baja, como sucede a tiempos inferiores de incubación donde el número de células presente es mucho menor que a los 4 días.

Debido a estas consideraciones se decidió utilizar otro método de ensayo de proliferación celular alternativo a los anteriores, también basado en medidas de actividad metabólica, el ensayo de Alamarblue™ (AB), cuya principal diferencia reside en la determinación de medidas de fluorescencia (Nociari *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 2000).

En la Figura 61 se muestran los resultados de proliferación celular similares a los presentados previamente, pero obtenidos mediante el ensayo de AB. Se observa de nuevo un comportamiento similar entre los diferentes quitosanos al descrito con las anteriores técnicas para esta concentración de polímero en la Figura 61-A. El nivel de significación con respecto al control de plástico es, en todos los casos, extremadamente significativo ($P < 0,0001$). Sin embargo, cuando se excluye la columna control y se comparan todos los quitosanos entre sí, el valor de P es mucho mayor, $P = 0,002$, sugiriendo que las diferencias entre los quitosanos son menores que las indicadas por las técnicas anteriores, a pesar de ser muy significativas.

Se corroboran como superficies que favorecen la proliferación celular el Q4, Q5, Q9, Q11 y Q12. Todos ellos presentan bajo o intermedio Mw, DD elevados y ángulos de contacto inferiores (a excepción del Q4).

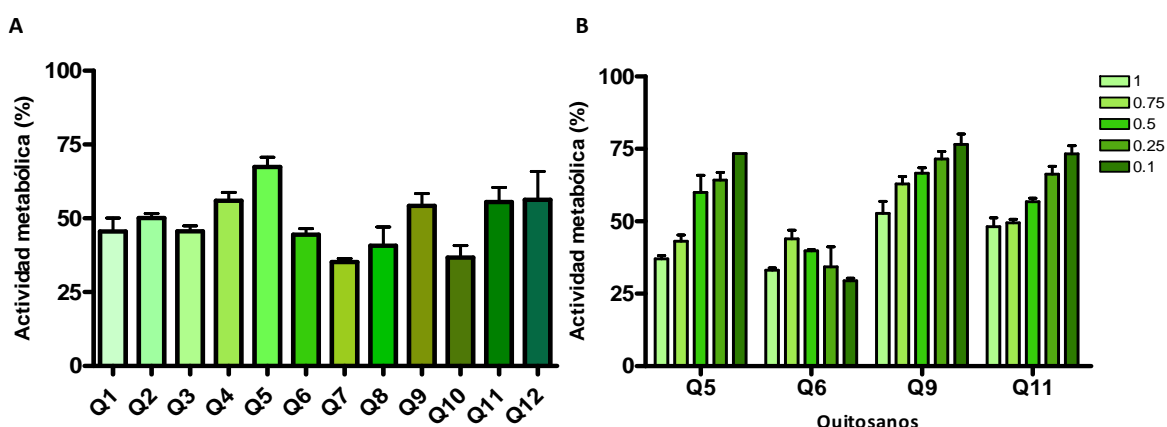


Figura 61. Determinación de la proliferación celular sobre filmes de quitosano mediante ensayo de AB. A) Todos los filmes preparados a una sola concentración (0,25%) y B) Diferentes quitosanos representativos de los grupos de Mw a diferentes concentraciones (%) de polímero en el filme.

De hecho un post-test de Dunnet comparando todas las columnas con el Q5, el de mayor nivel de proliferación, indica que los anteriores quitosanos son los únicos que no presentan diferencias significativas con el mismo. La comparación de todos los quitosanos entre sí, mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey, señala a los quitosanos Q7, Q8 y Q10 como los responsables fundamentales del nivel de significación presentando $P < 0,01$ con respecto al Q5, y siendo quitosanos de bajo DD, elevado Mw y ángulos de contacto θ superiores al resto (cerca de 90°).

Los resultados obtenidos empleando diferentes concentraciones de polímero para la obtención de los filmes de quitosanos seleccionados en los experimentos anteriores (Q5, Q6, Q9 y Q11) se muestran en la Figura 61-B. El ANOVA de dos vías realizado sobre los mismos muestra, al igual que en casos anteriores, influencia extremadamente significativa de las dos variables consideradas (quitosanos y concentraciones), así como una fuerte interacción entre las variables ($P < 0,0001$). El quitosano Q6, correspondiente al grupo de alto Mw, muestra resultados no significativos en todas las concentraciones testadas, indicando la no influencia de la concentración en el mismo, mientras que en el resto de quitosanos testados existen diferencias muy significativas entre los valores de altas y bajas concentraciones.

El ANOVA de dos vías realizado sobre la matriz traspuesta indica que las principales diferencias significativas se obtienen entre el quitosano Q6 y algunas, o todas, las concentraciones del resto de quitosanos. Si tenemos en cuenta que dentro del análisis previo se había obtenido la no significación de los valores obtenidos para el quitosano Q6 con la concentración, se optó por realizar el mismo análisis de la varianza de dos vías, pero excluyendo al Q6 del mismo.

Los resultados que se obtienen en este caso varían de forma importante pues el test global es significativo. Identifica la concentración como la variable responsable de manera fundamental del nivel de significación, con un $P < 0,0001$, mientras que el tipo de quitosano también influye, pero su nivel de significación es mucho menor, $P < 0,05$. Por otra parte, y más importante, se obtiene que no existe interacción entre las variables.

Los resultados obtenidos, que se han de restringir a los quitosanos seleccionados, representantes del grupo de Mw bajo, se pueden corroborar mediante un ajuste lineal de la señal obtenida frente a la concentración de quitosano para los diferentes tipos testados. En todos los casos se obtienen valores de r^2 comprendidos entre 0,937 y 0,967. Los resultados del mismo, junto con los intervalos del 95% de confianza para las rectas de regresión se muestran a continuación en la Figura 62-A.

El test de igualdad de pendiente de estos ajustes lineales indica que las pendientes obtenidas de los quitosanos de Mw bajo o intermedio y alto DD (Q5, Q9 y Q11) se pueden

considerar iguales. Existe un claro aumento de la proliferación celular al disminuir la concentración de quitosano empleado en el filme, siendo los niveles de este aumento independientes del tipo de quitosano empleado. Es decir, los datos se ajustan a rectas de igual pendiente, pudiéndose obtener un valor promediado para ésta común a todos ellos, mostrándose el resultado del ajuste conjunto de los tres quitosanos estudiados en este apartado, Q5, Q9 y Q11, en la gráfica 62-B, promediando los valores obtenidos a cada concentración para los diferentes quitosano.

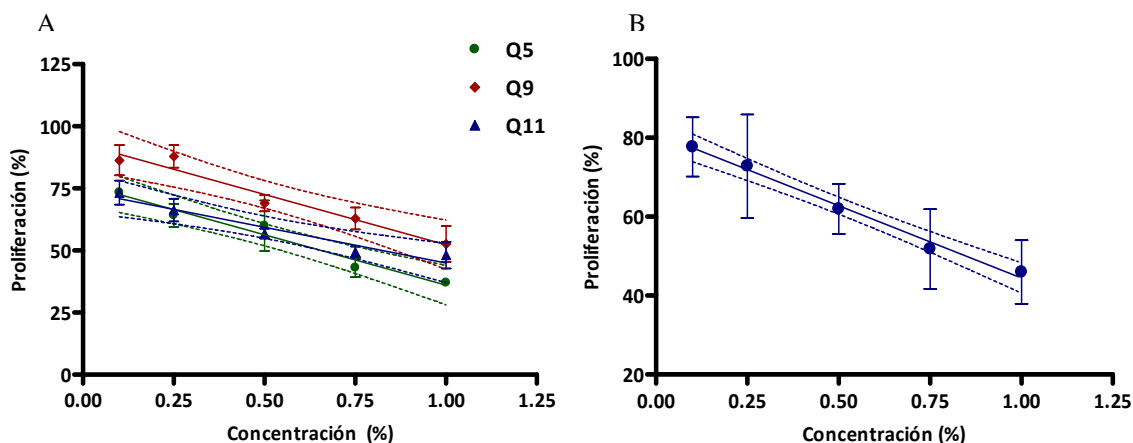


Figura 62. A) Representación del ajuste lineal de los datos obtenidos para los quitosanos de Mw intermedio y bajo. B) Ajuste conjunto de regresión para los quitosanos de bajo Mw. La recta obtenida presenta un valor de r^2 de 0,9904 y la ecuación $y = (81,10 \pm 1,280) - (36,65 \pm 2,085) \cdot X$.

Los resultados obtenidos de la gráfica anterior, donde se han representado también los intervalos de confianza del 95% para la recta de regresión obtenida, aportan una idea bastante aproximada de los niveles de proliferación (con respecto al control de plástico) que se pueden obtener en función de la concentración de quitosanos de Mw bajos y alto DD. Estos resultados se deberán matizar por la influencia del tipo de quitosano concreto empleado en la proliferación, ya que el test de igualdad de ordenadas indica que éstas son significativamente diferentes, es decir, que el valor de proliferación máximo obtenido va a depender fuertemente del tipo de quitosano seleccionado dentro de este grupo.

Como se ha observado en los resultados anteriores, los valores obtenidos con los distintos filmes de quitosano son, en el mejor de los casos, un 80% de los alcanzados sobre la superficie control. Para intentar encontrar las razones de estas diferencias, se optó por realizar un seguimiento temporal de los cultivos, mediante las técnicas ya empleadas de MTS y AB con un sólo quitosano (Q11- 1,0%).

De los resultados de la gráfica mostrada en la Figura 63 se puede apreciar que el crecimiento celular de la línea C2C12 sigue un comportamiento exponencial sobre ambas superficies, como era de esperar. Pasadas 72 horas se produce ya la saturación de la monocapa en las células cultivadas en plástico tratado para la adherencia celular, por lo que esta ecuación deja de poder aplicarse a tiempos superiores. Sin embargo se puede observar mediante ambas técnicas la existencia de cierto retraso en la proliferación celular sobre los filmes de quitosano.

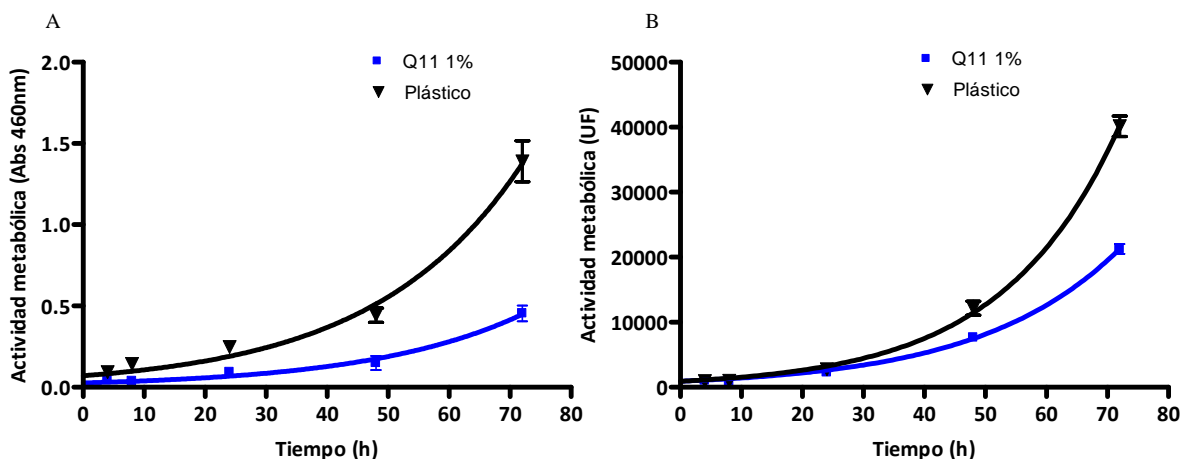


Figura 63. Resultados de la proliferación de la línea celular C2C12 sembradas sobre PC y filmes de quitosano (Q11-1,0%) en función del tiempo empleando el ensayo de MTS (A) y AB (B).

Tabla 9. Valores obtenidos del ajuste de los datos de proliferación del ensayo con MTS y AB empleando Q11-1,0%

		Q 11-1,0%	PC
MTS	K	0,03925	0,04120
	Tiempo de duplicación	17,66	16,83
	R ²	0,9116	0,9602
AB	K	0,04359	0,05244
	Tiempo de duplicación	15,90	13,22
	R ²	0,9959	0,9974

Se obtiene un mejor ajuste de los datos experimentales empleando la técnica del AB tal y como se muestra en la Tabla 9. El MTS, al tratarse de medidas de absorbancias, presenta menor sensibilidad que las de AB (basadas en fluorescencia), siendo éste hecho especialmente importante a tiempos bajos, donde el número de células no es muy elevado. En ambos casos, sin embargo, se observa que la constante de tiempo de duplicación correspondiente a las diferentes superficies es distinta, siendo la diferencia entre ambas más notable en el caso del ensayo de AB, tal vez debido a la mayor sensibilidad de la medida.

Para corroborar el retraso del crecimiento celular sobre los filmes de quitosanos se realizó un estudio similar al anteriormente descrito empleando filmes de quitosano Q11-1,0% sembrados a una densidad de 10.000 células /cm². En esta ocasión se observó de forma visual los cambios en la morfología celular en función del tiempo, comparándolos con el PC. En la Figura 64 se puede observar, mediante la tinción Texas Red Phalloidin, los citoesqueletos de actina de la línea celular C2C12 sembrada sobre plástico control (parte superior) y sobre filmes de Q11-1,0% (parte inferior) a diferentes tiempos. Se puede apreciar que existe ya una notable diferencia a las 24 horas en la morfología celular. Asimismo se observa una gran diferencia en la proliferación celular en función de tiempo, observando un retraso a los 4 días.

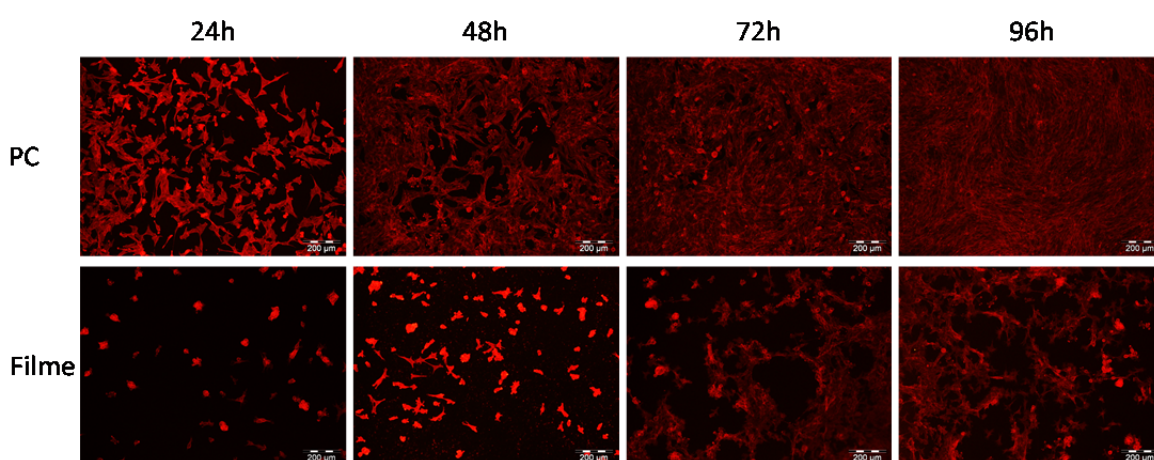


Figura 64. Seguimiento de la morfología celular de las C2C12 sobre PC (en la parte superior) y filmes de Q11-1,0% (en la parte inferior) mediante tinción del citoesqueleto celular (Texas red phalloidin).

Este retraso observado en la proliferación sobre los filmes de quitosano puede deberse a diversos factores, aislados o en combinación. Como posibles causas se podrían destacar tres situaciones diferentes:

- La adherencia celular inicial es menor en el caso del quitosano y, al partir de un menor número inicial de células, se necesita más tiempo para alcanzar los mismos niveles de señal que en el caso del plástico control.
- La adherencia celular inicial es la misma para ambas superficies, pero se miden actividades metabólicas que pueden verse afectadas por la superficie extraña a las células sembradas. Aun habiéndose adherido inicialmente el mismo número de células, la señal producida sobre la superficie de quitosano es menor que en el caso del plástico.

- Se adhieren inicialmente el mismo número de células en ambas superficies, pero las actividades metabólicas que se detectan son características del estado de adhesión inicial. Es decir, en la etapa inicial de adherencia celular ambas superficies actúan de forma muy similar, pero las siguientes etapas hasta alcanzar una adhesión firme (desarrollo de puntos focales, extensión y aplanamiento celular) se requiere tiempos más prolongados sobre el filme de quitosano, ya que han de reconocer y adaptarse a la nueva superficie con la que entran en contacto. Esta adhesión firme es necesaria para que dé comienzo el proceso de proliferación celular.

Para esclarecer este fenómeno, se decidió estudiar el proceso de adhesión celular durante las primeras 24 horas empleando el ensayo de AB. Con objeto de determinar en qué momento comienza el proceso de proliferación celular, se decidió realizar un seguimiento de la actividad metabólica en función del tiempo. Se compararon tres quitosanos de bajo Mw con respecto al plástico control a distintos puntos temporales (1, 2, 3, 4, 6 y 24 horas).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 65, donde se puede observar que no existen diferencias entre las distintas superficies (Q4, Q11, Q12 y CP) durante las primeras 24 horas post-siembra ($P= 0,8624$).

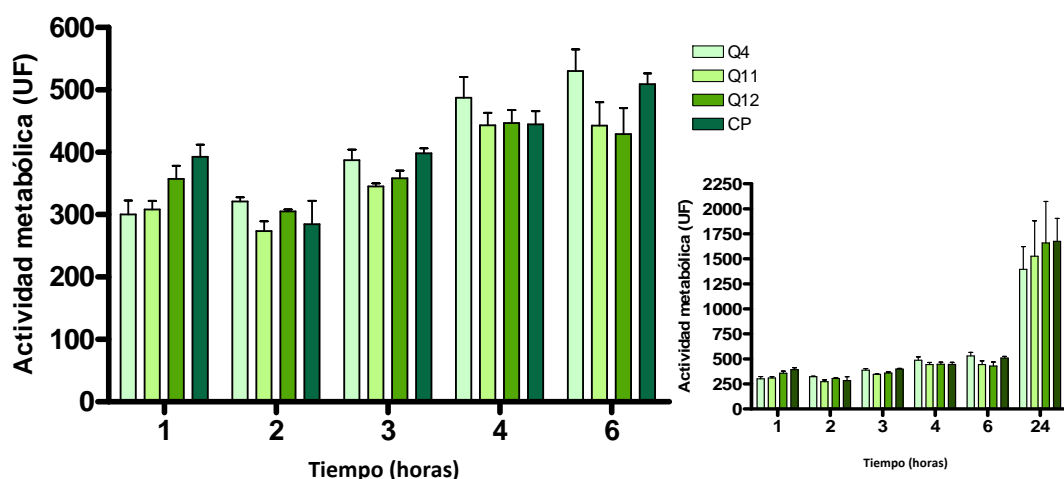


Figura 65. Estudio de la adhesión celular de la línea C2C12 sembrada sobre quitosano (0,25 %) y PC en función del tiempo empleando el ensayo de AB.

El ANOVA de dos vías realizado sobre los datos obtenidos indica que existen diferencias significativas debido a la influencia del tiempo, como es de esperar dada la gráfica presentada (ver inserto) ($P<0,0001$).

Para detectar si existía un origen de la significación además de la evidente a 24 horas, se realizó adicionalmente un ANOVA de una vía con un post-test de comparación múltiple de

Bonferroni entre todos los puntos temporales hasta las 6 horas. En él se obtiene que no existe significación entre los valores de 1, 2 y 3 horas entre sí, pero sí con los correspondientes a 4 y 6 horas ($P < 0,01$ en todos los casos). Dados estos resultados se decidió estudiar las diferencias entre los diferentes quitosanos en la adhesión celular a 4 horas de la siembra.

Se realizó inicialmente un ensayo evaluando el comportamiento de filmes de todos los quitosanos (0,25%) empleados en este estudio y extendiendo el mismo a diferentes concentraciones para algunos de ellos, comparando en cada caso con el PC, mediante ensayo de AB. Los resultados obtenidos para los niveles de adhesión de todos los quitosanos se muestran en la Figura 66-A. La realización de un ANOVA de una vía, indica que sí existen diferencias significativas en el tipo de quitosano, siendo el nivel de significación $P < 0,01$. Cabe destacar el nivel de significación obtenido en este análisis, el cual es de 10 a 100 veces inferior al obtenido en test similares realizados en los estudios de proliferación anteriores, indicándonos esto un nivel de similitud entre los diferentes quitosanos mucho mayor en el proceso de adhesión celular.

La realización del post-test de Tukey, indica que las diferencias significativas existen sólo entre los quitosanos Q1 y Q7 (de alto Mw), con respecto a Q9 y Q12 (de bajo Mw) mostrando un valor de significación $P < 0,05$, siendo el resto de comparaciones realizadas entre el resto de quitosanos no significativas ($P > 0,05$). Cabe señalar que los quitosanos con mayores niveles de adhesión presentan mayor Mw, sin embargo fueron los mismos que alcanzaron menores niveles de niveles de proliferación. Tal vez esta mayor adhesión inicial esté relacionada con la mayor rugosidad que presentan los filmes de este tipo de quitosanos.

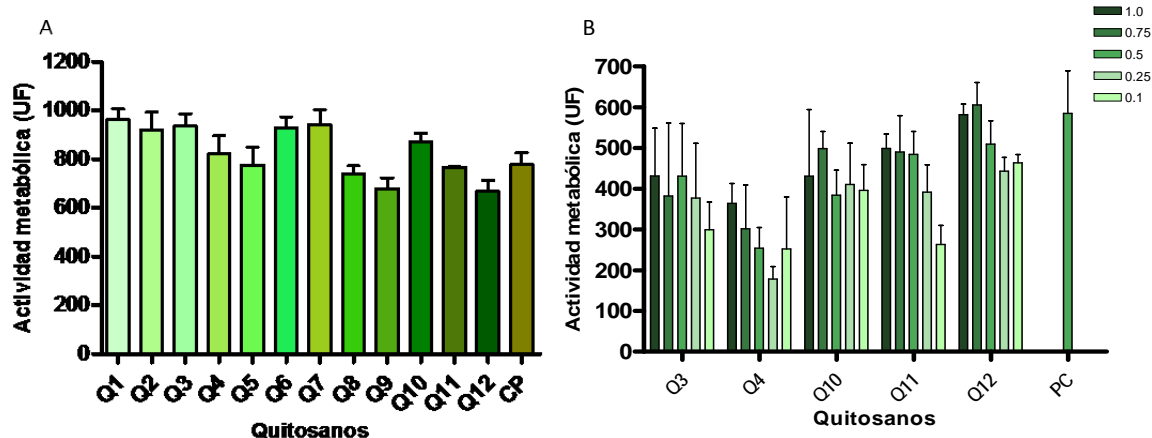


Figura 66. Determinación de los niveles de fluorescencia en el proceso de adhesión de los diferentes tipos de filmes. A) Todos los quitosanos a una misma concentración (0,25%) y B) Quitosanos seleccionados a cinco concentraciones (%) diferentes.

En la Figura 66-B se presentan los resultados obtenidos empleando diferentes concentraciones de polímero. La realización del ANOVA de dos vías indica que las dos variables consideradas (quitosano y concentración) presentan una influencia extremadamente significativa en los resultados ($P < 0,0001$), pero no existe interacción entre las mismas, lo cual nos permitirá posteriormente analizarlas independientemente.

La realización de un post-test de Bonferroni comparando todas las columnas con respecto al PC, indican que existen diferencias significativas dependiendo de la concentración empleada en la realización del filme. A concentraciones elevadas (1,0%), no existen diferencias significativas de ningún quitosano con el control de plástico ($P > 0,05$), indicando que la adherencia a 4 horas es la misma en este tipo de filmes independientemente del quitosano, y comparable en todos ellos al control.

A medida que disminuye la concentración de quitosano en el filme, van apareciendo diferencias más y más significativas para el quitosano Q4, de muy bajo Mw, pasando éstas de $P < 0,05$ para una concentración de 0,75%, a $P < 0,01$ para 0,5% y a $P < 0,001$ para 0,25%. Al llegar al 0,1% sólo dos quitosanos siguen siendo no significativos respecto al PC, el Q10, (alto Mw), y el Q12 (alto DD). El resto de quitosanos presentan niveles significativos con el plástico a esta concentración de quitosano.

Estos resultados son opuestos a los presentados en cuanto a niveles de proliferación y tal vez puedan parecer contradictorios, pero se debe tener en cuenta que estamos hablando de fenómenos diferentes y, como hemos visto, parece que uno de los factores que puede favorecer este proceso de adhesión inicial es la rugosidad de los filmes. Precisamente los valores altos de rugosidad, de 400-600 nm aproximadamente se encuentran, dentro de cada quitosano, en los filmes de mayor concentración (1,0%). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos con otras líneas celulares (Amaral *et al.*, 2007; Fakhry *et al.*, 2004).

Posteriormente a esta adhesión inicial, se ha de producir un proceso de extensión y un aplanamiento celular, alcanzando una adhesión firme y sólida mediante la formación de adhesiones focales, sobre la superficie antes de que comience el proceso de proliferación.

En este análisis el Q12 merece mencionarse pues no presenta diferencia significativa en ningún caso con respecto al PC, sin embargo, el quitosano homólogo que se diferencia del mismo sólo en el grado de desacetilación (Q11 con un 85% frente a un 92% del Q12), se encuentra que éste último si presenta un nivel de significación $P < 0,01$ para los filmes del 0,1%. Este hecho parece señalar, por tanto, a un grado de desacetilación elevado como más favorable para los procesos iniciales de adhesión celular, tal vez por la presencia de una mayor densidad de carga debida al mayor número de grupos amino libres. Este hecho se corrobora con numerosos estudios que confirman que un DD elevado conduce a una mayor adhesión y

proliferación celular sobre filmes de quitosano (Amaral *et al.*, 2007; Freier *et al.*, 2005).

La no significación ya mencionada de la interacción entre las variables tipo de quitosano y concentración, nos hizo plantearnos si era posible un ajuste lineal de los datos obtenidos para cada uno de los quitosanos, y en caso de ser así, si era posible describir todos ellos mediante una sola ecuación.

En la Figura 67 se muestran los resultados de los ajustes lineales realizados con los valores normalizados al PC (100%).

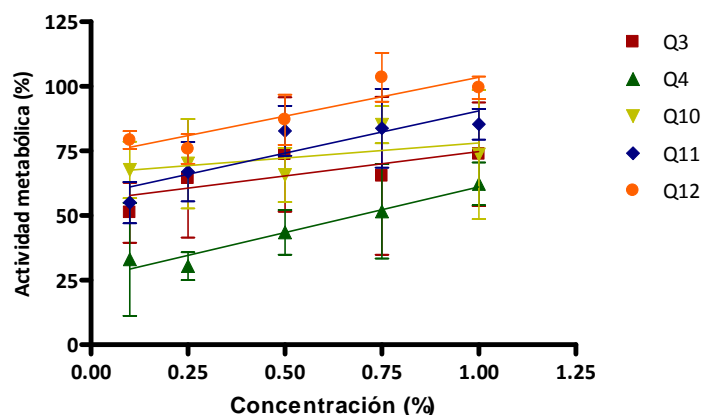


Figura 67. Representación de la regresión lineal de los datos obtenidos en el ensayo de adhesión sobre filmes de diferentes quitosanos. No se muestran en este caso los intervalos de confianza al 95% por claridad de exposición.

Los ajustes realizados muestran que sólo existe una tendencia lineal, es decir, una pendiente significativamente distinta de cero, para tres de los quitosanos empleados, Q4, Q11 y Q12, siendo los valores de r^2 para los mismos de 0,95; 0,80; y 0,82 respectivamente. Los valores de r^2 para los otros quitosanos Q3 y Q10 son 0,56 y 0,31 respectivamente, incluyendo el intervalo de confianza del 95% para la pendiente el valor de 0, indicando estos hechos la no correlación entre los valores obtenidos y la concentración para estos quitosanos.

A pesar de lo expuesto, resulta llamativo que los valores de las pendientes obtenidas en dichos ajustes presentan una tendencia a aumentar a medida que disminuye el Mw de los quitosanos. Si ordenamos éstos en orden decreciente de Mw obtenemos la serie de $Q10 > Q3 > Q11 \approx Q12 > Q4$, siendo las pendientes correspondientes a los mismo quitosanos 11,74; 18,91; 32,66; 30,16 y 35,25 respectivamente. No obstante, la gran amplitud de los intervalos de confianza de algunas de las rectas obtenidas impide profundizar en los resultados obtenidos.

Por último, merece la pena señalar que el test de igualdad de pendientes para las diferentes rectas obtenidas no es significativo, es decir, todas las rectas se pueden describir mediante una única pendiente promedio, considerando todos los datos independientemente

del quitosano, de valor 27,17 lo que refleja el hecho de los amplios intervalos de confianza del 95% para las rectas de regresión precedentes. Más importante es el hecho de que este test lleva asociado un test de igualdad de ordenadas, que presenta un nivel de significación muy elevado ($P < 0,0001$). Este hecho indica que los quitosanos presentan niveles de adhesión muy diferentes, es decir, será necesaria la “adecuación” del quitosano elegido a su empleo como superficie para cultivos celulares.

Un detalle importante se observa en el quitosano Q10, ya que es un quitosano que debido a su bajo DD (73%) y un elevado ángulo de contacto (90°), podría considerarse como una superficie poco favorable para los procesos celulares. Dicho quitosano mostró cierta independencia de la concentración de polímero en la actividad metabólica obtenida durante el proceso de adhesión (observado por una menor pendiente 11,74) e indicando la gran influencia su elevado Mw (1362 KDa) en dicho proceso.

Llegados a este punto, se optó por realizar comparaciones según la clasificación de Mw realizada anteriormente. Para ellos se realizó un ANOVA de una vía comprobándose, que no existen diferencias significativas entre los quitosanos dentro de cada grupo ($P > 0,05$).

Ante estos resultados se procedió a calcular la media y desviación de los valores de cada uno, considerando a los quitosanos que formaban parte de los mismos como un sólo quitosano. Una vez agrupados se realizó otro ANOVA de una vía comparando estos valores promediados obtenidos y representados en la Figura 68. El resultado del mismo en este caso fue de muy significativo, con $P < 0,0001$. No obstante el post-Test de Tukey condujo al siguiente resultado: No existen diferencias de comportamiento entre los quitosanos de Mw alto e intermedio ($P > 0,05$), pero sí de éstos con respecto a los quitosanos de bajo Mw ($P < 0,001$ para las dos comparaciones posibles, Alto Mw vs Bajo Mw e Intermedio Mw vs Bajo Mw), siendo por tanto éste último el origen de la significación.

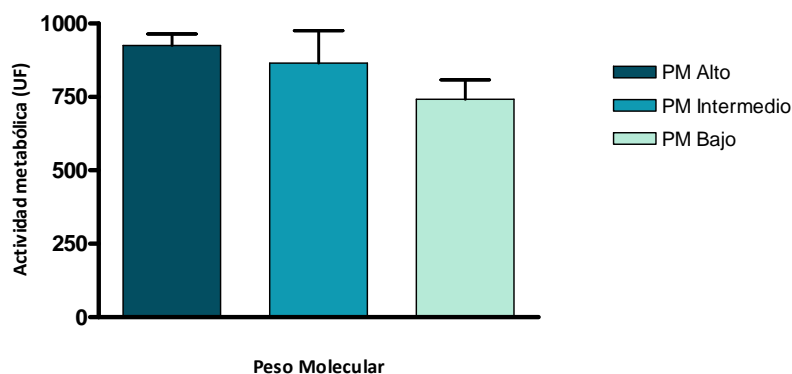


Figura 68. Adhesión de todos los quitosanos al 1,0% reagrupados en función de su Mw tras 4 horas de incubación mediante la determinación de la actividad metabólica del ensayo de AB.

Para corroborar e ilustrar los resultados obtenidos mediante una metodología diferente a la anterior, se realizó un estudio inmunohistoquímico, mediante tinciones del citoesqueleto de actina y del núcleo celular, para estudiar el proceso de adhesión celular sobre un quitosano de bajo Mw (Q11), en función de las concentraciones utilizadas del mismo (Figura 69).

Como se puede observar, se corroboran los resultados encontrados para este quitosano mediante la técnica de AB previa, observándose un aumento en la densidad de células adheridas al aumentar la concentración de quitosano empleada en la formación del filme, siendo sólo próxima a la del control de plástico cuando ésta es del 1,0%.

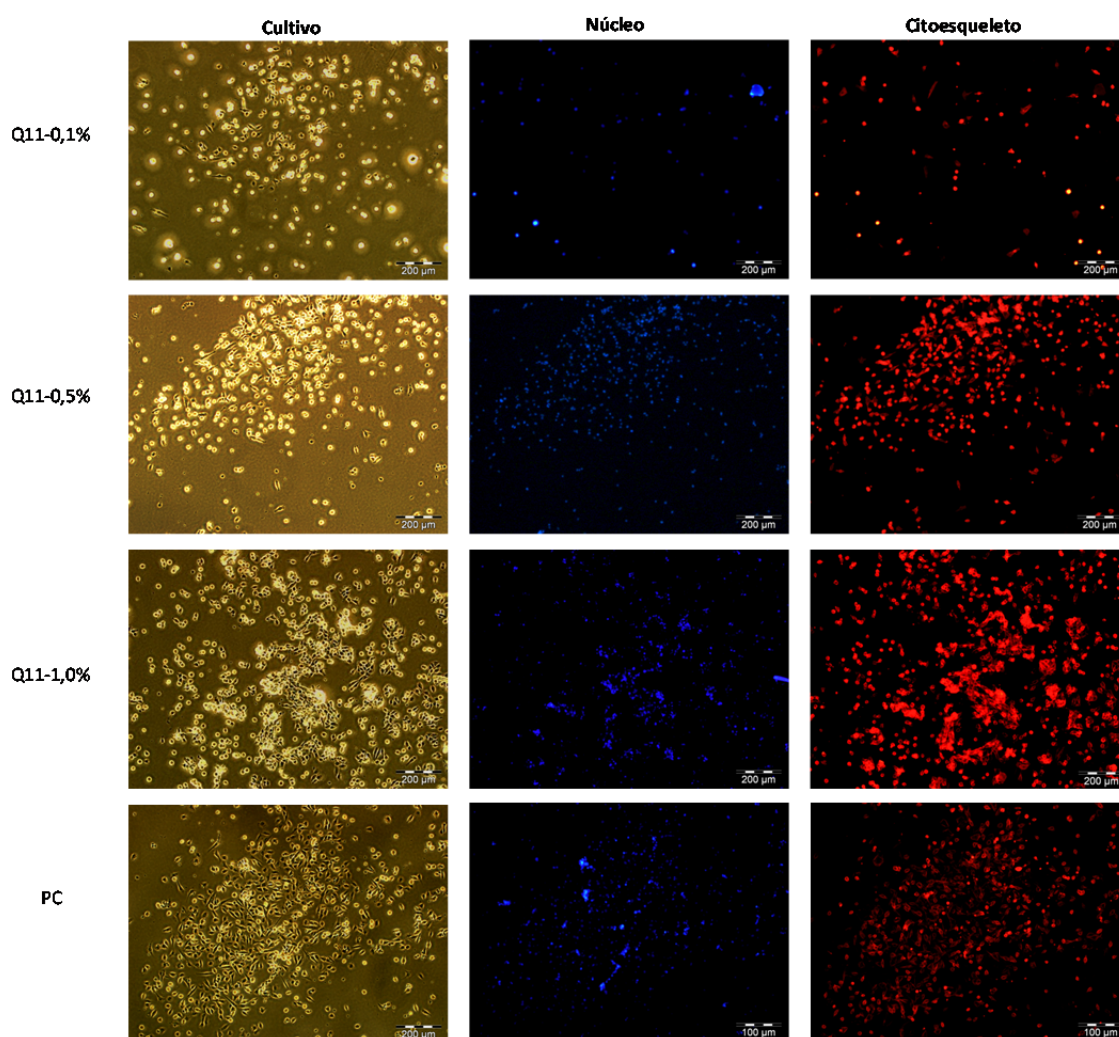


Figura 69. Imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia obtenidas tras el ensayo de adhesión a 4 horas, sobre filmes de diferentes concentraciones de Q11. En primer lugar se muestran las imágenes del cultivo celular fijado, y a continuación se expone la tinción del núcleo celular (Hoechst) y el citoesqueleto de las células (Texas Red Phalloidin).

En el caso de los filmes preparados con soluciones de 1,0% de polímero, donde la densidad de células adheridas es mayor, se destaca la formación de uniones celulares, es decir la adhesión que se está produciendo no es sólo con respecto al sustrato sino también con las células vecinas, formándose agrupaciones que evolucionarán a agrupamientos celulares o “clusters”, (imágenes mostradas en la diferenciación celular).

Además la morfología de las células adheridas sobre los filmes de quitosano difiere ligeramente de la encontrada en las adheridas sobre el control de plástico. Sobre el filme, predomina la morfología redondeada del proceso de adhesión inicial, mientras que en el control de plástico las células presentan una morfología algo más triangular, indicativa de una adhesión más desarrollada. Las células muestran mayor aplanamiento y por lo tanto presentan una mayor superficie de contacto con el soporte (véase la Figura 70).

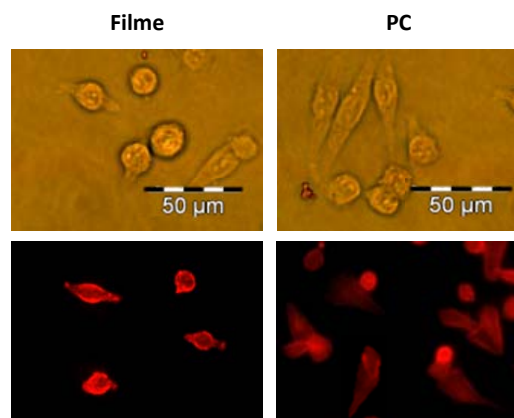


Figura 70. Aumentos de las microfotografías tras el ensayo de adhesión (Q11-1,0%). En la parte superior se muestran las imágenes del cultivo celular, y en la parte inferior las imágenes correspondientes a la tinción de citoactina. Se observan las diferencias en la morfología celular e incluso las extensiones celulares menos desarrolladas que contactan con la superficie de los filmes.

Como se indicó previamente en los antecedentes del grupo, la principal aplicación desarrollada en Ingeniería de Tejidos para estos filmes, ha sido su empleo como transportador biodegradable de la rhBMP-2, con objeto de estimular la regeneración ósea. En este apartado se decidió estudiar el efecto que la proteína presente en dichos filmes (filmes activados) produce no sólo sobre la diferenciación celular, sino también sobre la adhesión y proliferación de las células.

Para evaluar los diferentes procesos celulares sobre filmes activados, se procedió a la detección de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), marcador óseo temprano del proceso de osificación, según el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (López-Lacomba *et al.*, 2006; Abarrategi *et al.*, 2008a).

Como se ha indicado anteriormente, las células C2C12, preoblásticas de ratón y carentes *per se* de dicha actividad ALP, son capaces de diferenciarse bajo la acción de la rhBMP-2 a linaje osteoblástico, mostrando como consecuencia de este proceso una actividad ALP importante, característica de células osteoblásticas.

En un primer momento se evaluó la proliferación celular tras 4 días de cultivo sobre filmes de todos los quitosanos al 0,25% y con una cantidad fija de rhBMP-2 incorporada (5 µg), comparando los resultados obtenidos con controles de plástico (con la misma cantidad proteína añadida al medio y sin ella) y los correspondientes filmes sin activar con rhBMP-2. Como blancos respectivos en ambas baterías se usaron triplicados de los mismos filmes (activados con proteína o sin activar), pero sin sembrar células sobre ellos.

Finalmente, y antes de pasar a comentar los resultados obtenidos, indicar que en estos experimentos se determinó el nivel de proliferación celular mediante el ensayo de Bradford, a pesar de las limitaciones expuestas anteriormente del mismo. La razón es que es el procedimiento estándar empleado en la literatura para caracterizar la actividad de dicha proteína recombinante y se optó por seguir el mismo.

En la Figura 71 se representan los valores correspondientes a la cantidad de proteínas totales obtenidas mediante el ensayo de Bradford. A simple vista se aprecia que la presencia de proteína en los filmes mejora notablemente la proliferación de las células. El test t de Student comparando globalmente la proliferación en quitosanos sin proteína frente a los que llevan incorporados la proteína presenta un valor extremadamente significativo, un $P < 0,001$ ($P = 0,0004$).

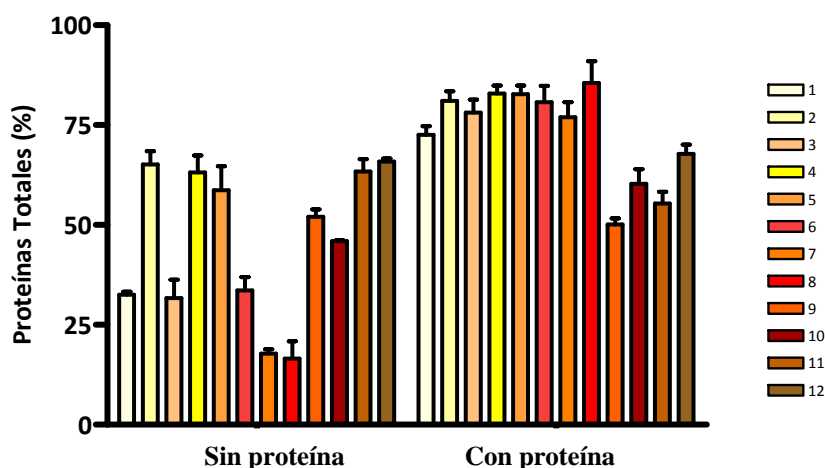


Figura 71. Determinación de las proteínas totales del cultivo celular (4 días) sobre filmes con 5 µg de rhBMP-2 y sin ella expresados en porcentaje respecto a sus PC.

El porcentaje medio de proliferación celular alcanzado con respecto al control de plástico mostrado en los dos conjuntos de datos, de un 45,54% en los filmes sin rhBMP-2 frente a un 72,83% en los filmes con rhBMP-2. En este primer análisis no tenemos en cuenta los diferentes quitosanos sino simplemente la presencia o ausencia de proteína.

Para analizar la influencia que produce la presencia de la rhBMP-2 en cada uno de los quitosanos se realizó un ANOVA de dos vías. El resultado del mismo es extremadamente significativo para cada una de las variables, presencia o no de rhBMP-2 y tipo de quitosano, con un $P < 0,0001$ para ambas, existiendo una importante interacción entre las mismas con un $P < 0,0001$.

La realización del post test de Bonferroni comparando los valores obtenidos para cada quitosano en las dos condiciones con y sin proteína, produce varios resultados interesantes. En primer lugar se destaca que para los quitosanos Q9, Q11 y Q12 no existe influencia de la presencia de rhBMP-2 en los niveles de proliferación alcanzados a los 4 días, siendo el resultado del test de no significativo ($P > 0,05$). Es de señalar que estos quitosanos figuran entre los de mayores niveles de proliferación obtenidos mediante AB en los resultados mostrados previamente. Otro grupo de quitosanos está constituido por Q2 y Q10, con un valor de P significativo ($P < 0,05$), mientras que el resto presentan diferencias extremadamente significativas entre los valores con y sin proteína ($P < 0,0001$, excepto el Q4 cuyo valor es $P < 0,001$).

Por lo tanto, en la inmensa mayoría de los quitosanos estudiados, la presencia de proteína en el filme mejora la proliferación celular, haciéndola muy comparable a la obtenida en el plástico control.

Si realizamos el análisis de la matriz transpuesta del ANOVA de una vía de los resultados obtenidos con quitosanos activados con rhBMP-2 observamos que, quitosanos de Mw altos e intermedios (en principio con menor proliferación celular en ausencia de proteína), presentan diferencias muy significativas con respecto a los quitosanos de bajo Mw, donde recordando de nuevo los resultados anteriores, había mayor proliferación y niveles de adhesión inicial iguales o menores, algo que parecía de alguna manera contradictorio.

Ya en ese momento apuntábamos la hipótesis de que el proceso determinante que permite la proliferación no era la adhesión inicial, sino una etapa de adhesión intermedia, donde tiene lugar el aplanamiento celular y la adhesión firme sobre la superficie. Es muy posible que la presencia de rhBMP-2 en la superficie del filme facilite este proceso de adhesión, en aquellos quitosanos donde éste, de alguna manera, estaba más "impedido" aunque tuvieran una mayor adhesión inicial que aquellos quitosanos, de bajo Mw y/o alto DD, donde la proliferación era mayor a estas concentraciones del filme.

Es decir, en estos últimos quitosanos era posible observar una cierta proporción de células algo más extendidas, aplanadas a las 4 horas post siembra, mientras que en los quitosanos de alto Mw estaban prácticamente todas las células adheridas, pero redondeadas, en la etapa inicial de adhesión, y con preferencia en algunos casos, a la interacción célula-célula en lugar de célula-superficie, provocando la formación de cúmulos celulares.

La presencia de la proteína en dicha superficie puede favorecer de forma importante las interacciones células-superficie, al unirse éstas a través de su receptor “forzando” en cierta forma, el proceso de adhesión firme necesario para la posterior fase de proliferación (Fakhry *et al.*, 2004; Bumgardner *et al.*, 2003a).

Por este motivo se fotografiaron los cultivos a las 24 horas de incubación de filmes con y sin proteína. De nuevo no se aprecian diferencias entre ambas superficies (con y sin proteína) en cuanto a densidad celular. Este hecho es debido a que la proteína rhBMP-2 requiere un tiempo determinado para poder unirse a los receptores celulares, y desencadenar la cascada de señalización celular. El efecto de diferenciación hacia linaje osteoblástico comienza con células que previamente se encuentran adheridas y en fase de proliferación celular. No obstante dicho proceso inicial de adhesión se encuentra favorecido por la presencia de proteínas que actúan de anclaje en la superficie, hecho que se refleja en la morfología celular, entre superficies activadas y sin activar con proteína, mostradas en las imágenes de la Figura 72.

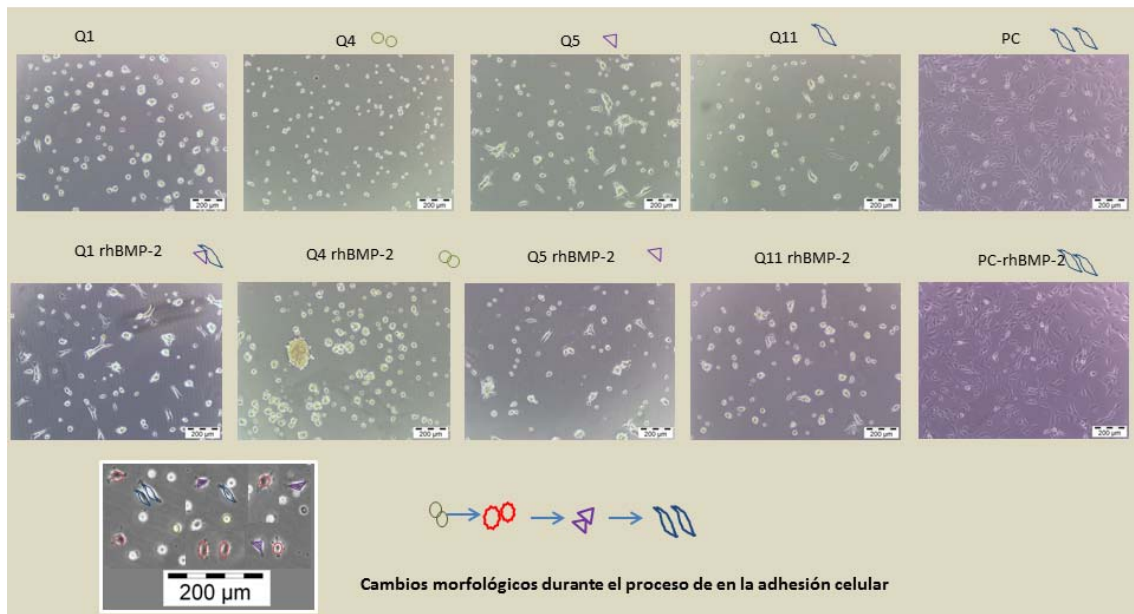


Figura 72. Imágenes de microscopía óptica de filmes de distintos quitosanos (0,25%) con y sin proteína (5 µg) a las 24 de incubación celular. Se muestran los cambios morfológicos que tienen lugar desde los contactos iniciales hasta la adhesión total. Se observa una morfología celular diferente (retrasada en el tiempo) con respecto al PC.

La diferenciación celular se evaluó gracias a la detección de ALP en las células que han estado en contacto con filmes que llevan la proteína. En ausencia de la rhBMP-2 (células que estuvieron en contacto con filmes sin activar), la presencia de dicha enzima no es detectable por el ensayo dado su prácticamente nulo nivel de expresión (resultados no mostrados).

En la Figura 73 se muestran los resultados de actividad ALP, determinada a través de la A_{405} , obtenida en el ensayo realizado para los filmes activados usados previamente en el análisis de proteínas totales. Dicha figura muestra resultados difíciles de interpretar debido a varias limitaciones presentes en esta técnica.

La primera de ellas es la saturación producida en el detector a altas dosis de rhBMP-2, que como se puede observar en la Figura 73, los valores de absorbancia (A_{405}) superiores a 1,5; dejan de ser totalmente fiables. Más importante que ésta, es la variabilidad intrínseca que presentan los resultados de este ensayo, debido a la metodología del mismo (excesiva manipulación de los pocillos previa a la realización del ensayo).

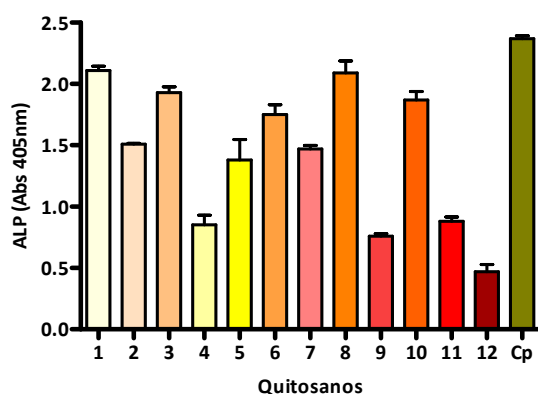


Figura 73. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina tras 4 días de cultivo de C2C12 crecidas sobre filmes a activados con proteína rhBMP-2 (5 μ g).

Por otra parte, la actividad detectada dependerá del número de células presentes en cada pocillo, por lo que una comparación de los valores de absorbancia detectados sólo es real cuando todos los pocillos tienen el mismo número de células, lo que depende de la proliferación producida en los 4 días de cultivo. Como se ha mostrado anteriormente en la Figura 71, éste no es nuestro caso.

Una forma rápida para comparar los resultados obtenidos de los distintos quitosanos es normalizar en porcentajes tanto los resultados del Bradford como de Fosfatasa Alcalina con respecto a los valores obtenidos para el plástico control, y realizar los cocientes entre porcentaje de ALP y porcentaje de proteínas totales.

En la Figura 74-A se ofrecen los porcentajes de ambos ensayos respecto al control de plástico, mientras que en la Figura 74-B se muestra el cociente entre dichos porcentajes, normalizando los valores de actividad ALP por los de las proteínas totales presentes en el ensayo.

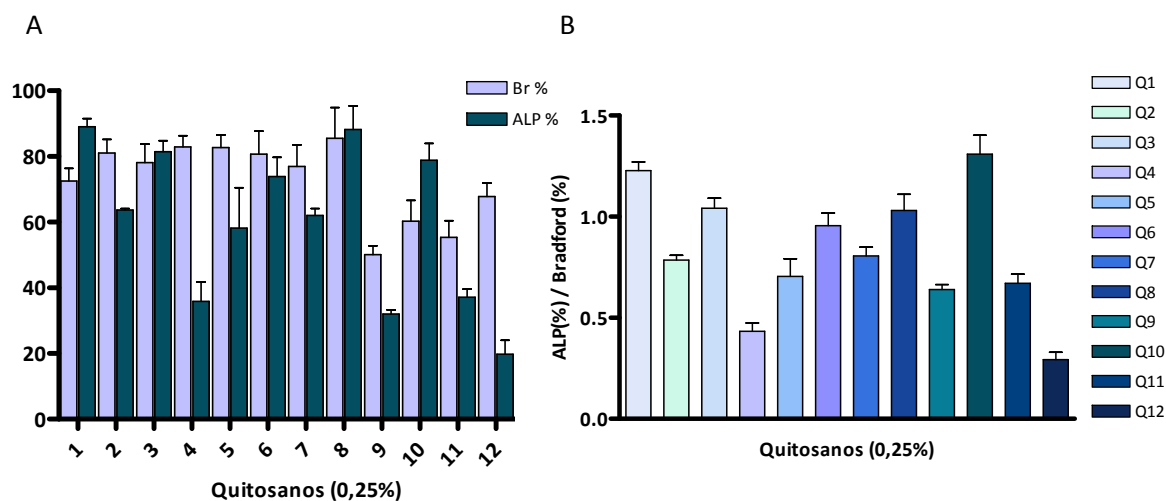


Figura 74. Representación de los resultados de ALP y Proteínas totales para los diferentes quitosanos (0,25%) con respecto al PC. En la gráfica de la derecha se muestra los resultados obtenidos de ALP (%) / Bradford (%) para cada uno de los quitosanos.

Si comparamos la Figura 74-A con la obtenida directamente de la representación de las A_{405} (Figura 74-B) vemos que el comportamiento global es muy similar en ambas para los diferentes quitosanos.

El ANOVA de una vía indicando que existen diferencias significativas entre los quitosanos empleados ($P < 0,0001$). Por otra parte, el post-test de Tukey realizado para la actividad ALP normalizada por las proteínas totales comparando todas las columnas entre sí, produce resultados extraordinariamente complicados, mostrando un amplio intervalo de valores de P según que quitosanos se comparen entre sí.

Siguiendo la agrupación anteriormente realizada basada en los Mw se obtuvo la Figura 75 teniendo en cuenta que el quitosano Q12, aunque pertenece al grupo de Mw bajos, su elevado DD y bajo ángulo de contacto, hace que al menos con respecto a esta característica de los filmes no pueda colocarse en este grupo.

La clasificación anterior es relativa, pues no existe una diferencia tajante entre algunos de los quitosanos incluidos en los grupos, es decir alguno de los integrantes de un grupo, por ejemplo, Q2 puede mostrar diferencias no significativas con algún integrante concreto de otro de los grupos (por ejemplo, frente a Q9 y Q11 o Q6 y Q10), y por lo tanto es muy difícil

establecer límites claros.

Previamente a la confección de la misma, se realizó un ANOVA de 1 vía dentro de cada uno de los grupos, con los quitosanos implicados en ellos, obteniéndose en todos los casos la no significación del mismo, $P > 0,05$ para todos los grupos.

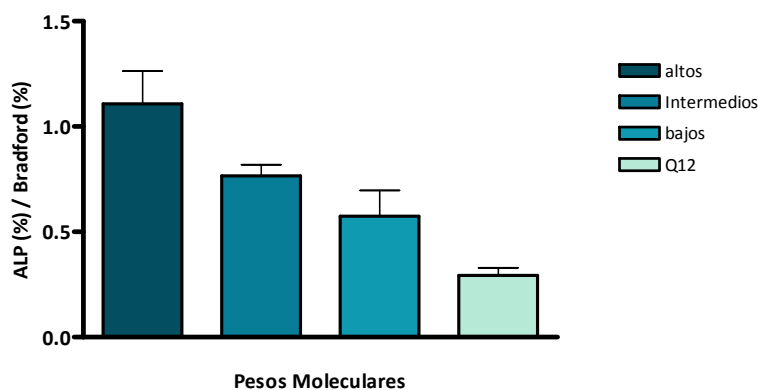


Figura 75. Representación de los resultados de ALP (%) / Bradford (%) de los quitosanos (0,25%) agrupados en función de su Mw y como excepción el Q12 con un elevado DD.

El análisis de una vía correspondiente a esta agrupación produce valores de P extremadamente significativos, $P < 0,0001$. El post-test de Tukey indica que existen diferencias significativas entre todos los grupos considerados, siendo el menor nivel de significación de $P < 0,05$, correspondiente a la comparación entre el grupo de Mw intermedios y el grupo de Mw bajos. En todos los demás comparaciones el valor de P estuvo entre $P < 0,01$ y $P < 0,001$.

Llegados a este punto cabe preguntarse el porqué de todas estas diferencias e incluso, aunque comprendido dentro del error experimental, como es posible que algunos quitosanos superen los valores obtenidos para el plástico (hay que tener en cuenta que al control de plástico le corresponde un valor del 100% tanto en actividad ALP como en proteínas totales, por lo que su relación sería de 1).

Creemos que una explicación plausible radica en que, en el fondo, las células no están experimentando realmente la misma dosis de rhBMP-2. Es decir lo que se está midiendo claramente es la cantidad de ALP producida pero, para que esa ALP aparezca previamente se ha tenido que unir la rhBMP-2 a los receptores correspondientes existentes en las células C2C12 y desencadenar la cascada de señales que provocan la diferenciación de éstas células hacia el linaje osteoblástico.

Por lo tanto lo importante es la cantidad de rhBMP-2 presente realmente en contacto próximo con las células sembradas. La cantidad total de rhBMP-2 presente en todas las

superficies es de 5 μg , de la cual sólo una pequeña parte estará en contacto directo con las células desde el primer momento.

En principio esa densidad superficial de proteína será menor en el PC, donde se ha dispersado la proteína en el volumen completo del medio de cultivo (400 μl), que sobre cualquiera de los filmes de quitosano, cuyo volumen es mucho menor. En estos filmes, según los datos obtenidos en la caracterización fisicoquímica, el volumen de los mismos aumenta con el Mw del quitosano, por lo que en principio esa densidad superficial disminuye al aumentar éste. Es más, en estos últimos casos habría que distinguir entre la densidad inicial superficial, y la densidad existente en la superficie una vez producido el hinchamiento del mismo a lo largo del tiempo de cultivo que permita la migración de la proteína tanto a la superficie como al medio en contacto con ella, de forma que se puedan ir activando las nuevas células provenientes de la proliferación celular.

El hinchamiento también depende del Mw, siendo mayor al aumentar éste. Un mayor hinchamiento significa menores restricciones a la movilidad de la proteína dentro del filme tanto para homogeneizar la densidad de la misma en su seno como para equilibrarse con el medio de cultivo. Los hechos anteriores nos llevan a proponer la variación del coeficiente de autodifusión de la proteína como la causa responsable de estas variaciones detectadas en el *ratio* ALP (%) / Bradford (%) con las diferentes superficies de quitosano. La difusión más fácil y rápida en los quitosanos de alto Mw permite que los resultados sean comparables perfectamente a los obtenidos con el plástico control.

A medida que disminuye la longitud de las cadenas, existen mayores restricciones al libre movimiento de la rhBMP-2 en el filme hinchado, movimiento impedido además por la existencia de interacciones inespecíficas y electrostáticas entre las cadenas, presentes en mayor número al disminuir el Mw. Finalmente, estas interacciones son máximas en el caso del quitosano Q12, que aun presentando un Mw similar, por ejemplo, al Q11, ostenta un grado de desacetilación mucho mayor que éste, lo que implica una mayor densidad electrostática en dichas cadenas.

Una vez estudiado el comportamiento conjunto de filmes, activados con 5 μg de rhBMP-2, de los diferentes quitosanos empleados en este trabajo, se decidió seleccionar uno de ellos, y explorar el efecto que produce en la diferenciación celular la presencia de dosis más elevadas de proteína recombinante. Se prepararon filmes de quitosano Q9 al 1,0%, y se activaron 10, 20 y 50 μg de rhBMP-2 por filme, sembrándose sobre los mismos 10.000 células/ cm^2 y evaluándose, como en casos anteriores, el comportamiento a los 4 días post-siembra.

En la Figura 76-A se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de proteínas totales respecto al control de plástico con proteína. Como se puede apreciar, los filmes con diferentes cantidades de rhBMP-2 mostraron el mismo comportamiento entre ellos, y muy diferente con respecto a filmes sin activar. El ANOVA de una vía de dichos valores indica la existencia de diferencias extremadamente significativas ($P < 0,0001$). Estas diferencias se deben a la columna correspondiente al filme al 1,0% sin proteína, tal como señala el post-test de Tukey realizado ($P < 0,001$ para cada una de sus posibles comparaciones), mientras que no existen diferencias significativas entre el resto de grupos ($P > 0,05$). Cabe mencionar el tremendo aumento en la proliferación que experimentan las células sobre el quitosano Q9 a pesar del aumento de la concentración del mismo comparado con el experimento anterior, esto es debido al incremento de la cantidad de rhBMP-2 incorporada en el filme, de forma que es prácticamente comparable a los niveles del PC.

En cuanto a los resultados del ensayo de ALP, mostrados en la gráfica de la derecha (Figura 76-B) destacan las diferencias muy significativas entre el filme control y el plástico control, ambos sin proteína, con respecto a los activados con proteína ($P < 0,001$). En cambio el filme con menor cantidad (10 μg) fue el único que presentó diferencias significativas con respecto al PC con proteína y el filme activado con 50 μg ($P < 0,01$). Las demás superficies, filmes con 20 y 50 μg no mostraron diferencias ni entre ellas ni con el PC con factor ($P > 0,05$).

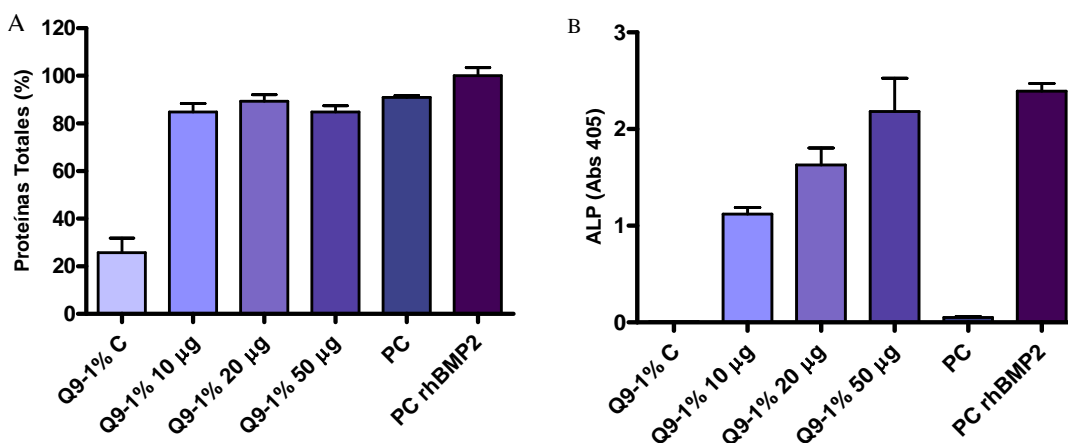


Figura 76. Cantidad de proteínas totales (A) y actividad ALP de las células C2C12 cultivadas sobre filmes de quitosano (Q9-1,0 %) en función de la concentración de proteína rhBMP-2. Se empleó 5 μg de proteína rhBMP-2 para el PC.

Paralelamente, se realizó un estudio de seguimiento diario del ensayo anterior mediante microscopía óptica, mostrándose las imágenes obtenidas en la Figura 77.

En estas imágenes, se observa el mismo comportamiento celular independientemente de la cantidad de proteína rhBMP-2 presente en el filme, que contrasta con el mostrado en los filmes sin proteína. En ellos se observa un claro retraso en la proliferación celular, notable a partir de las 48 horas de cultivo, momento donde también se observa la formación de agrupamientos celulares “clusters”, que van aumentando en número y tamaño, a medida que avanza el tiempo de incubación celular.

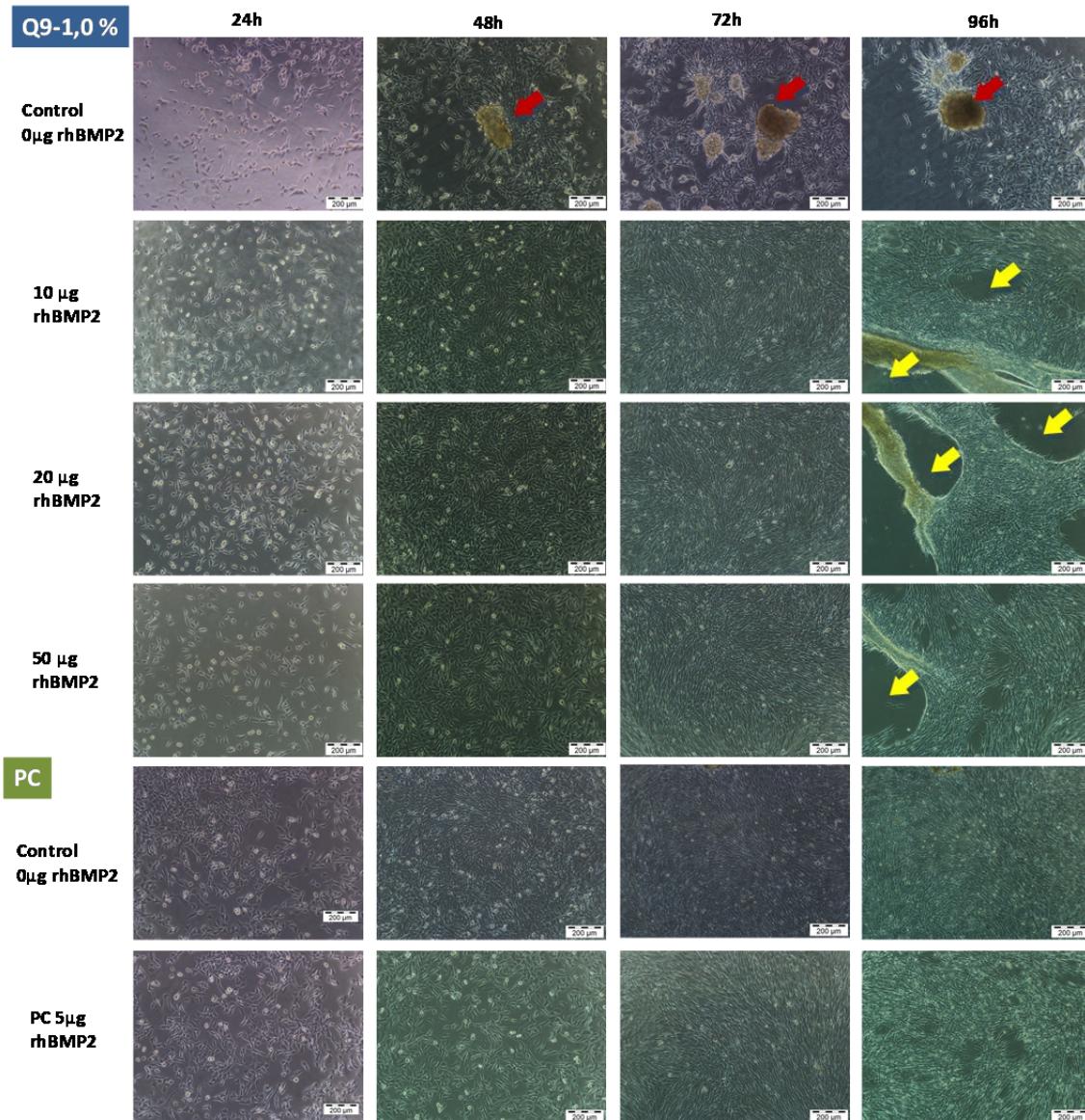


Figura 77. Microfotografías de las células C2C12 sembradas sobre los filmes Q9 (1,0%) con y sin proteína, empleando un microscopio de óptica inversa. Las flechas rojas indican los clusters celulares y las amarillas el levantamiento de la monocapa celular.

Al cuarto día post-siembr no se distinguen diferencias entre los filmes con distinta cantidad de proteína, pudiéndose observar no sólo la confluencia celular sino incluso el despegue ocasional de la monocapa de células. Este hecho podría justificar las diferencias significativas observadas tras el análisis estadístico de los resultados de ALP obtenidos.

Otro factor a tener en cuenta es la presencia de agregados celulares, siendo este un fenómeno frecuente en los biomateriales que se implantan en el organismo (Tomimata y Ikada, 1997). En ellos las células al contactar con la nueva superficie mediante su interacción con los receptores de membrana, identifican al sustrato como un cuerpo extraño, pudiendo preferir para su mejor supervivencia el establecimiento de interacciones célula-célula en lugar de célula-superficie y originando la formación de estos “clusters” celulares. Dicho efecto de agrupación celular ha sido descrito con anterioridad para filmes de quitosanos detallando que aquellos filmes con mayor DD presentaron menor número de clusters celulares. En cambio los filmes con menor DD, mostraron numerosos clusters y señalan la presencia de células apoptóticas en ellos (Freier *et al.*, 2005).

Para finalizar este apartado, mostramos los resultados obtenidos en la diferenciación celular con tres quitosanos diferentes en Mw y DD a una misma concentración de quitosano (0,5%) con una dosis de rhBMP-2 extraordinariamente alta (100 µg/filme) dosis empleada por ser equivalente a la utilizada en la realización de numerosos ensayos *in vivo* para la evaluación de oseointegración de implantes. Para ello se sembraron 10.000 células por filme con y sin proteína rhBMP-2 y se cultivaron durante 4 días, momento en que se realizaron los ensayos de Bradford y ALP correspondientes.

En Figura 78 se representa a la izquierda los resultados obtenidos correspondientes al ensayo de Bradford (A) y a la derecha los resultados del ensayo de ALP (B). Como se puede observar son evidentes las diferencias entre filmes con y sin rhBMP-2.

El análisis de proteínas totales produce resultados similares a los mostrados en experimentos anteriores, con un fuerte aumento de la proliferación en los filmes activados con proteína. No obstante este aumento de la proliferación es menor que en el caso anterior, tal vez por la dosis tan grande de rhBMP-2 presente, aunque sigue siendo homogéneo el nivel de proliferación existente.

Los análisis realizados indican, como es de esperar, diferencias extremadamente significativas ($P < 0,0001$) entre los controles de quitosano (no significativos entre sí) y el de PC. La comparación de los valores de los distintos quitosanos activados produce resultados no significativos entre ellos ($P > 0,05$), pero aumenta el nivel de significación con respecto al PC, también activado, existiendo en este caso diferencias significativas ($P < 0,01$).

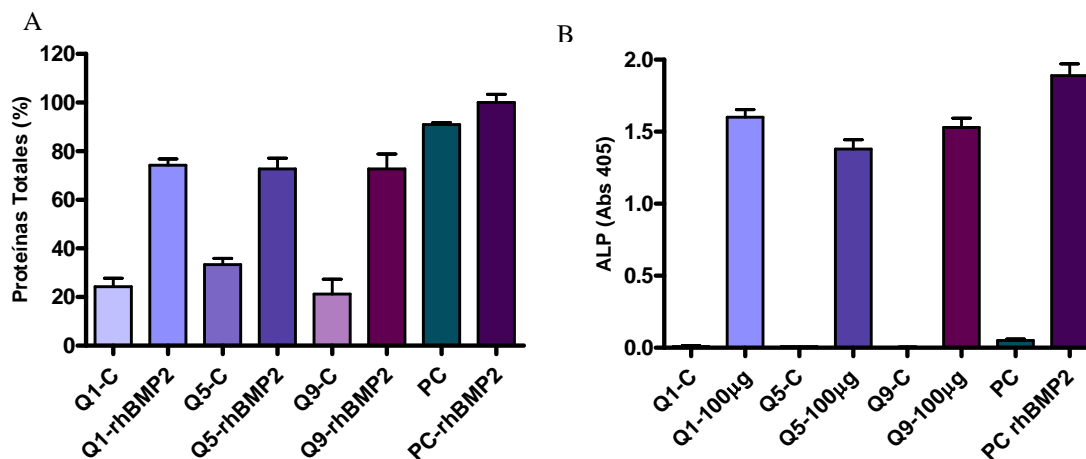


Figura 78. Cantidad de proteínas totales (A) y actividad ALP (B) de las células C2C12 sembradas sobre filmes de quitosano. Se emplearon tres tipos de quitosano (0,5%), de diferente Mw y DD y una cantidad fija de proteína rhBMP-2 (100 µg por filme).

El análisis de los resultados de los ensayos de ALP los centraremos sólo en las superficies activadas, puesto que la comparación de las superficies sin proteína añadida es no significativa en todos los casos. El ANOVA de una vía realizado indica que existen diferencias significativas en las superficies consideradas, siendo el valor de $P < 0,01$. El post-test de Tukey realizado indica que existen diferencias significativas con el control de plástico activado que oscilan, según el quitosano, entre $P < 0,01$ (Q5) y $P < 0,05$ (Q1 y Q9). Un detalle importante en este experimento son los menores valores de actividad ALP obtenidos, en comparación con los encontrados para la misma superficie (Q9), en el estudio anterior. Este hecho se explica por el efecto inhibitorio que pueden producir dosis demasiado grandes de proteína en contacto con las células (Liu *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2012).

Durante la incubación del ensayo anterior, se realizó asimismo el seguimiento de los cultivos por microscopía óptica, para evaluar y/o confirmar las diferencias en el comportamiento de las células C2C12 sobre los filmes.

En las imágenes de la Figura 79 correspondientes al seguimiento temporal de este ensayo, por microscopía óptica, se puede visualizar las diferencias descritas previamente en los ensayos de Bradford y ALP. Las diferencias, dentro de un mismo quitosano con y sin proteína, son notables con respecto a la proliferación celular. Durante las primeras 24 horas, apenas se observan claras diferencias entre quitosanos e incluso con sus respectivos filmes activados. El efecto de la proteína no se visualiza hasta las 48 horas, donde los filmes sin rhBMP-2 muestran el inicio de agregados celulares que van en aumento en el cultivo celular.

Analizando con más detalle la presencia de agregados celulares se puede observar que estos son diferentes en tamaño y número en función del tiempo de ensayo y el tipo de quitosano empleado en los filmes. Dicha formación podría estar estrechamente relacionada con las características propias del quitosano. Así por ejemplo, los clusters que aparecen sobre filmes de Q1 son abundantes y de menor tamaño. En cambio, los agregados en el filme de Q5 son menos abundantes en principio, y de tamaño similar a los anteriores, observando un perfil de proliferación próximo al PC. El quitosano Q9 presenta “clusters” de gran tamaño pero de forma aislada mostrando una proliferación celular similar a la observada en el Q5.

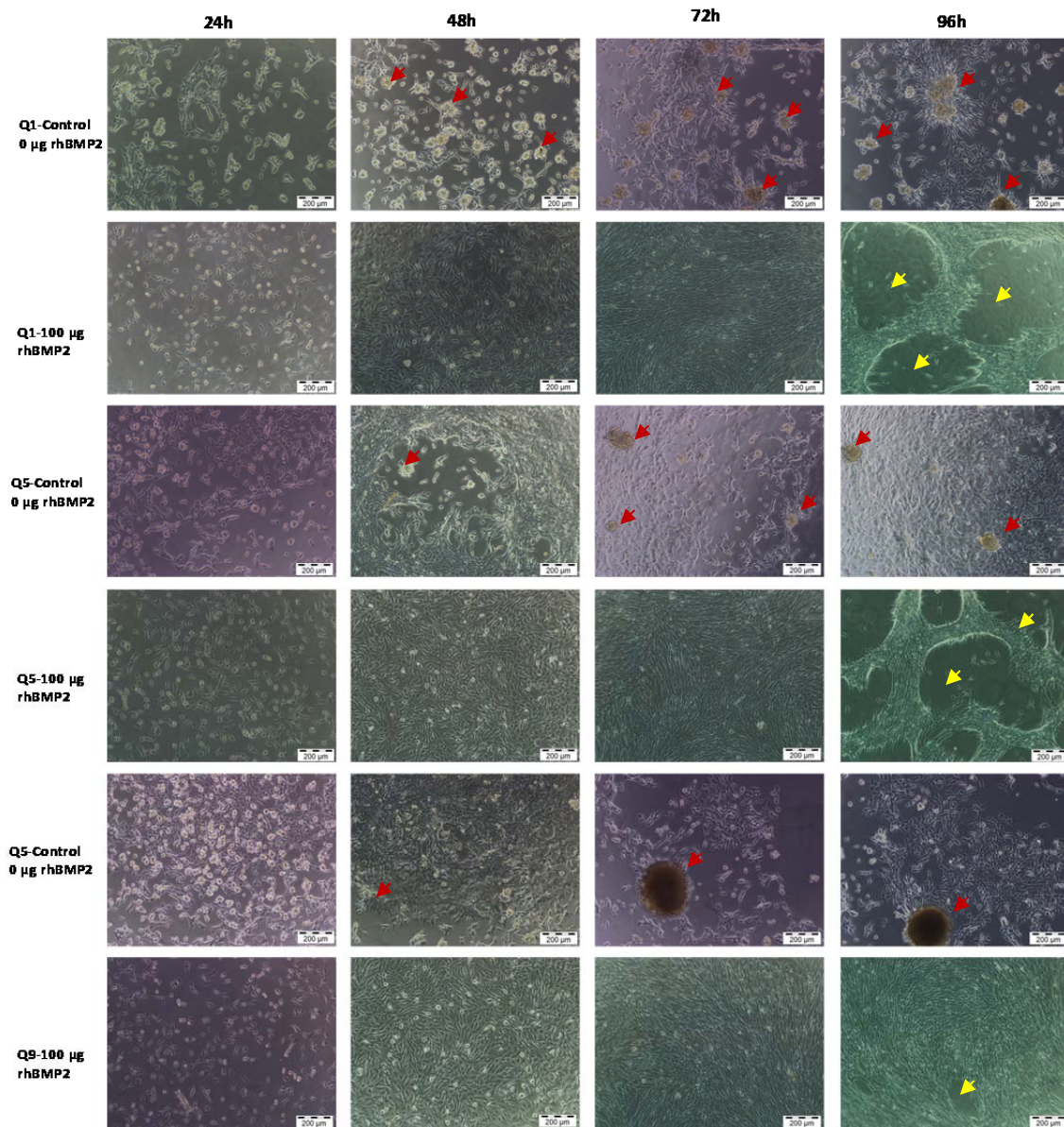


Figura 79. Microfotografías de los cultivos de C2C12 sobre los filmes sin proteína y con 100 µg de rhBMP-2, empleando un microscopio de óptica inversa. Las imágenes del control de plástico se muestran en la Figura 77.

En cambio, la formación de dichos “clusters” no se detecta en los cultivos sobre los filmes activados a lo largo del ensayo. Este hecho se debe a la presencia de la rhBMP-2 en el filme que, no sólo acelera los procesos de adhesión (acortando la fase de contacto total con la superficie al favorecer el aplanamiento y la extensión celular) sino de proliferación, homogeneizando el comportamiento celular con respecto al control de plástico.

Gracias a las microfotografías se observa de forma cualitativa que a 72 horas no hay diferencias entre los mismos, pudiendo confirmar que los filmes con proteína actúan de la misma manera, sin mostrar diferencias visuales entre ellos.

Como resumen de los resultados obtenidos en este conjunto de estudios *in vitro* podríamos decir que se ha observado un retraso en la proliferación celular en el tiempo con respecto al PC, tras 4 días de incubación. Analizado las dos variables, tipo y concentración de quitosano empleada en la formación de filmes, se ha observado que el Mw es un parámetro de enorme importancia que influye en el comportamiento de células crecidas sobre los filmes.

Se ha observado asimismo, que quitosanos de Mw bajo (Q4, Q5, Q9, Q11 y Q12) muestran los mejores niveles de proliferación celular (alcanzando valores del 80% a 4 días mediante diferentes técnicas). Además dichos quitosanos presentan un DD elevado y un ángulo de contacto bajo (a excepción del Q4 en este caso) siendo por lo tanto las superficies más favorables para los procesos celulares.

La variable concentración de polímero empleada para la formación de filmes es un factor que influye de la misma manera para cada quitosano, destacando mejores niveles de proliferación celular en los filmes con menor concentración de polímero.

El crecimiento celular mostró un comportamiento exponencial similar en ambas superficies (plástico control y quitosano) en función del tiempo detectándose el retraso celular en las primeras 24-48 horas de incubación celular. Se encontró un tiempo de duplicación de la tasa celular menor en las células en contacto con los filmes de polímero

Para evaluar la causa de este retraso se estudió de forma más detallada la etapa inicial de adhesión celular, obteniéndose que tras 4 horas (tiempo mínimo donde se las interacciones entre células y soporte se vuelven estables) no existían diferencias significativas entre ambas superficies. Al contrario de lo observado en el proceso de proliferación celular, los quitosanos no mostraron diferencias significativas entre ellos, siendo el Mw un parámetro de menor influencia en este proceso celular.

La concentración de polímero sí ejerce un efecto patente en adhesión celular, observándose que se alcanzan mayores niveles de adhesión al emplear mayores concentraciones de polímero en el filme. Este hecho se encuentra íntimamente relacionado con las características superficiales del filme, obteniéndose niveles de adhesión celular

superiores sobre las superficies de mayor concentración, las cuales presentan mayor rugosidad.

La adhesión celular en filmes de quitosano mostró que el número de células adheridas en el proceso inicial es igual en las diferentes superficies (PC y quitosano) empleando elevadas concentraciones (1,0%). Este hecho indica que el retraso en la proliferación celular se localiza en una adhesión intermedia (en las etapas de aplanamiento y extensión) retrasando la adhesión completa de toda la superficie celular con el filme.

No obstante cuando trabaja con filmes activados con rhBMP-2 se observa que el efecto de la proteína incluida en los filmes predomina sobre el efecto que el filme de quitosano genera *per se* en el comportamiento celular, aumentando así los niveles de adhesión y proliferación celular y homogenizando los niveles de proliferación celular de los diferentes quitosanos.

Aunque todos los filmes activados presentaron mayores niveles de proliferación celular a 4 días de cultivo, este incremento fue más llamativo en aquellos quitosanos (de elevado Mw) que presentaron menores niveles de proliferación celular en ausencia de proteína. Estos mismos quitosanos a una misma concentración de polímero conllevan mayor espesor y rugosidad, parámetros que influyen directamente sobre la liberación y retención de la proteína y sobre las interacciones entre célula y polímero, favoreciendo los procesos celulares.

La adhesión celular se encuentra favorecida en todas sus etapas por la presencia de rhBMP-2 en el filme, actuando como una proteína de anclaje en la superficie y agilizando las siguientes fases de la adhesión celular. Los filmes sin proteína, sin embargo, mostraron la formación de agrupamientos celulares, relacionados con el Mw y el DD del quitosano.

Para finalizar las observaciones realizadas en estos experimentos, señalar que los filmes cargados con diferentes cantidades de proteína presentaron resultados similares de proliferación celular entre quitosanos y con el plástico control a los 4 días, incluso llegándose a observar el levantamiento de la monocapa celular. Altas dosis de rhBMP-2 en el filme pueden no ser favorables para los procesos de proliferación celular.

5. LIBERACIÓN DE LA PROTEÍNA rhBMP-2 DESDE FILMES DE QUITOSANO

La evaluación *in vitro* de la liberación de rhBMP2 desde filmes de quitosano se realizó mediante dos aproximaciones experimentales, que tienen por objeto el determinar tanto la proteína liberada al medio de cultivo (DMEM completo, pH 7,4) como la proteína remanente en el filme.

Para poder realizar estas determinaciones se optó por poner en contacto los filmes activados con rhBMP-2 con DMEM completo a 37 °C. A tiempos seleccionados se retiró a 4 °C y se almacenó el medio hasta finalizar el periodo de la liberación, momento en el que se realizó tanto la siembra de las células C2C12 sobre las placas usadas en la liberación (para determinar la proteína remanente en los filmes) como sobre placas de cultivos celulares estándar a las que se añadieron los medios de cultivos recogidos y almacenados (para determinar la proteína liberada). En dichos ensayos se determinó el aumento de la actividad ALP inducida en las células C2C12 a los 4 días de cultivo, bien por la rhBMP-2 liberada al medio, bien por la proteína remanente en el filme accesible a las células.

Para analizar los resultados obtenidos en los ensayos de ALP en términos de cantidad de proteína, es necesario realizar previamente una curva dosis respuesta sobre la misma línea celular empleada con cantidades añadidas conocidas de proteína recombinante. En este caso, se empleó un rango de concentraciones amplio que fue desde 0,1 hasta 50 µg de rhBMP-2.

El ajuste de los resultados obtenidos a una curva dosis-respuesta se muestra en la siguiente figura junto con los niveles de confianza del 95% para el mismo. El valor de r^2 para el ajuste obtenido es de 0,988 (Figura 80).

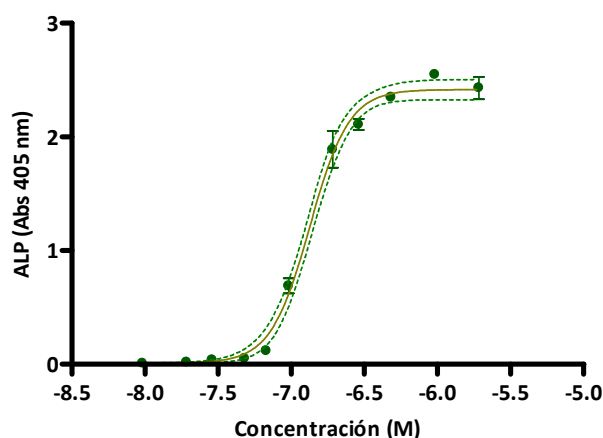


Figura 80. Representación del ajuste obtenido de la curva dosis-respuesta de la actividad ALP inducida sobre células C2C12 por concentraciones conocidas de proteína rhBMP-2.

Es importante mencionar que para realizar el ajuste anterior, fue necesario eliminar el dato obtenido con 50 μg de rhBMP-2 debido a que el valor de Abs_{405} (del orden de 1,2) refleja el hecho conocido de que dosis muy elevadas de rhBMP2 pueden inhibir la producción de ALP (Liu *et al.*, 2010).

Se realizaron adicionalmente diferentes test para controlar la normalidad de los residuales obtenidos (Shapiro-Wilk y D'Agostino & Pearson) así como test para la adecuación de los datos al modelo, obteniéndose resultados positivos en todos los casos.

La curva obtenida nos permitió transformar los valores de Abs_{405} determinados en los diferentes experimentos en microgramos de proteína liberados al medio o remanentes en el filme, según sea el caso. Se realizaron experimentos con distintos objetivos:

- Evaluar la influencia en la liberación de la proteína de la carga inicial de la misma presente en el filme.
- Evaluar la influencia en la liberación de la proteína de la concentración del filme portador.
- Evaluar la influencia en la liberación de la proteína en función del quitosano empleado.

Dado que el número de variables presentes en los estudios enumerados anteriormente es muy grande, en cada uno de ellos fue necesario seleccionar como constantes algunas de las variables implicadas en la descripción del sistema, sobre todo si tenemos en cuenta el elevado número de puntos temporales estudiados (1, 2, 4, 8 y 16 horas y 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de liberación, por triplicado cada uno de ellos).

5.1. LIBERACIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Para los estudios basados en variables cuantitativas (carga inicial de proteína en el filme y concentración del quitosano empleado en su formación) se eligió el quitosano Q11 como quitosano objetivo. Se seleccionó este quitosano por su facilidad (relativa) para la manipulación de disoluciones concentradas, por su adecuado DD y ángulo de contacto θ y por ser muy similar al Q12 de elevado DD.

Los medios recogidos del ensayo de liberación, que estuvieron en contacto con filmes de Q11 (0,25%) preparados con cinco concentraciones diferentes de rhBMP-2 (5, 10, 20, 50 y 100 μg de rhBMP-2) y la proteína retenida en los filmes tras los 7 días de liberación, se presentan en las Figuras 81 a 84.

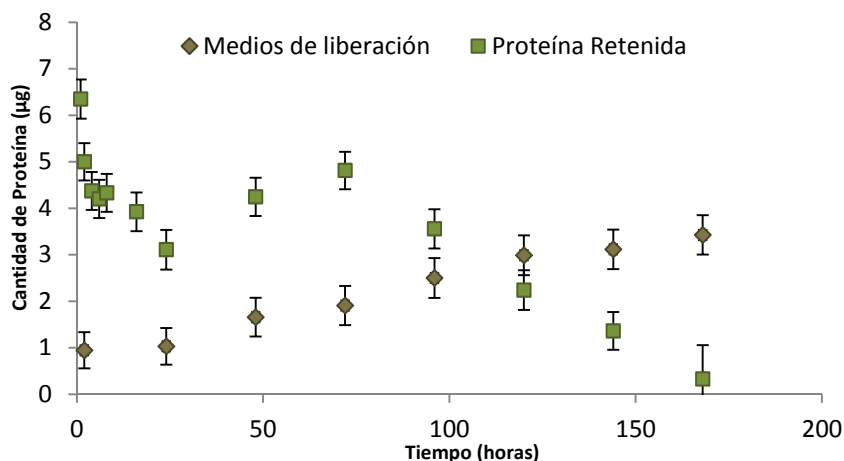


Figura 81. Cantidad de rhBMP-2 liberada desde filmes (Q11-0,25%) cargados con proteína (5 µg) y cantidad de proteína retenida por los mismos, no liberada, en función del tiempo.

Esta gráfica muestra de forma evidente los problemas que presenta este método a pesar de la coherencia, en líneas generales, de los resultados obtenidos tanto para la proteína retenida en el filme como proteína liberada al medio de cultivo con la que ha estado en contacto dicho filme.

Así, por ejemplo, para la liberación a 1 hora, el valor interpolado de la Abs_{405} obtenida en el ensayo de ALP indica que quedan más de 6 µg de proteína en el filme, hecho contradictorio con la carga inicial de proteína del mismo.

Este tipo de situaciones aparecerán en muchos de los resultados obtenidos por lo que se van a explicar a continuación. La variación de Abs_{405} producida por la rhBMP-2, una vez restado el blanco, como se muestra en la Figura 80 presenta poca exactitud para cantidades superiores a 3 µg de proteína. En dicha zona de saturación, los valores Abs_{405} están prácticamente fuera del límite de sensibilidad del detector y aun diluyendo diez veces los mismos prácticamente no se obtiene variación entre 2 y 10 µg de proteína (Abs_{405} en torno a 1 para todos ellos). Este hecho implica que pequeñas variaciones en los valores de Abs_{405} obtenidos hacen que se puedan obtener valores diferentes de los existentes realmente, no sólo debidas al pipeteo sino también a la presencia de restos de membrana en el lisado celular (Bethesda, 2009). De hecho, como veremos a lo largo de esta exposición y discusión de resultados, va a ser difícil distinguir diferencias entre los filmes por encima de 10 µg de carga inicial de proteína.

El otro extremo de la curva dosis-respuesta presenta problemas similares, pero opuestos, que aparecen en los medios de liberación. Los valores de Abs_{405} obtenidos para dosis de 0,1 a 0,7 µg de rhBMP-2 en el medio de cultivo varían en sólo 0,1 unidades de Abs_{405} , por lo que será difícil distinguir cantidades por debajo de 500 ng de proteína presentes en el medio

de liberación.

Aunque los hechos mencionados anteriormente proporcionan un carácter semicuantitativo a estos estudios, el análisis estadístico de los resultados y la coherencia interna de lo obtenido comparativamente entre filmes y medios de liberación permiten extraer conclusiones interesantes, que serán objeto de futuros trabajos.

De vuelta a los resultados mostrados en la Figura 81, correspondientes a los filmes con una carga inicial de 5 μg , observamos que en el caso de proteína remanente en el filme existe un comportamiento realmente complejo. Parece existir una disminución inicial de la proteína en el filme, debido al contacto con el medio de liberación, durante las primeras 24 horas, para a continuación, experimentar un aumento de ésta en la superficie del filme hasta las 48-72 horas.

Este comportamiento se puede apreciar solo en este caso, debido a que presenta menor carga inicial de proteína observándose, a tiempos largos, la depleción total o casi total de la misma.

Aunque no ha sido posible establecer de forma cuantitativa un modelo cinético que ajuste de forma global estos datos, se puede proporcionar una explicación cualitativa a los mismos, si se tiene en cuenta que los valores de Abs_{405} observados en este tipo de experimento responden (no a la proteína total en el filme), a la proteína presente en el mismo accesible a las células sembradas sobre él.

En este sentido los puntos temporales iniciales, muy próximos entre sí, reflejan el hecho de que no se ha dado tiempo a reponer la proteína superficial liberada al medio con proteína existente en capas internas del filme. Cuando el intervalo temporal entre retiradas consecutivas de medio de cultivo aumenta de 8 a 24 horas, el reservorio en el interior del filme es capaz de suplir en la superficie del mismo la proteína liberada. Pasadas las 72 horas no existe una cantidad suficiente de proteína en todo el filme para reponer la proteína retirada con el medio, por lo que en intervalos sucesivos se observa una disminución progresiva de la proteína remanente en la superficie del filme, de forma que a los 7 días de liberación obtenemos que la proteína remanente es de unos 0,3 μg solamente (véase la Figura 81).

Estos resultados son coincidentes, a grandes rasgos, con los obtenidos en los medios de liberación. Se puede observar en ambas gráficas que, a partir de las 48-72 horas se produce tanto una disminución sistemática de la proteína remanente en el filme como un aumento sistemático de la proteína liberada al medio. Los resultados obtenidos indican que en las primeras 48 horas, sólo se ha liberado entre 1 y 1,5 μg de proteína al medio de cultivo inicial, al mismo tiempo que la cantidad remanente en el filme disminuye aproximadamente en 1 μg .

La falta de datos que se observa en las primeras 24 horas con respecto a la proteína liberada al medio (sólo están los puntos correspondientes a las 2 y a las 24 horas), se debe al hecho ya indicado en la discusión sobre la curva dosis respuesta empleada en la determinación de los microgramos de proteína presentes. En ella no existen diferencias apreciables en la absorbancia obtenida entre 100 y 300 ng de proteína. Además el ajuste realizado fuerza a asignar un valor de $0,95-1,0 \pm 0,4 \mu\text{g}$ a estos valores de tiempo, estando probablemente los mismos algo sobreestimados.

A tiempos largos se observa un valor creciente de la cantidad de proteína presente en el medio hasta alcanzar un valor máximo de $3,5 \pm 0,5 \mu\text{g}$ de proteína total en el medio de cultivo.

Si comparamos las gráficas anteriores, obtenidas para una carga de $5 \mu\text{g}$ de rhBMP-2, con las obtenidas para una carga de $10 \mu\text{g}$ (o mayores) de la misma proteína se pueden observar algunas diferencias importantes (Figura 82).

En referencia a la cantidad de proteína remanente en el filme en función del tiempo, en la gráfica de $5 \mu\text{g}$ es evidente que a tiempos largos (7 días), dicha carga es prácticamente nula, incapaz al menos de inducir actividad fosfatasa alcalina en las células sembradas sobre dichos filmes. En cambio, la gráfica correspondiente al filme de $10 \mu\text{g}$ muestra que incluso a esos tiempos (7 días) queda remanente en el filme una cantidad importante de proteína, en algo más de un 60% de la cantidad inicial, tal como se obtiene de la curva dosis-respuesta de la que hemos interpolado los datos.

Por otra parte, los resultados obtenidos de proteína liberada al medio de cultivo son coherentes, en ambas dosis, con los mencionados para la proteína retenida. Así, en el filme de $5 \mu\text{g}$ existe un aumento continuado de la liberación de proteína al medio, alcanzándose prácticamente los $5 \mu\text{g}$ iniciales, teniendo en cuenta el error experimental existente tanto en la toma de datos como en la interpolación realizada, al cabo de 72 horas. En cualquier caso, dentro del error experimental como indicamos, la suma de proteína liberada y proteína remanente está comprendida entre $4-5,5 \mu\text{g}$ para todos los tiempos.

En el caso de $10 \mu\text{g}$ de carga en el filme, de nuevo el comportamiento de proteína remanente es coherente con el de proteína liberada. La disminución inicial a tiempos cortos de la proteína presente en el filme concuerda con el aumento inicial, a tiempos cortos también, de la proteína liberada al medio, detectada por el aumento de actividad ALP de las células incubadas con éste

Sin embargo a tiempos superiores a 48 horas parece que se alcanza unos niveles estacionarios en ambas gráficas, observándose quizás una ligera tendencia a la disminución de los valores presentes en el filme a partir de las 96 horas, mientras que los niveles de proteína

liberada al medio se mantienen estables.

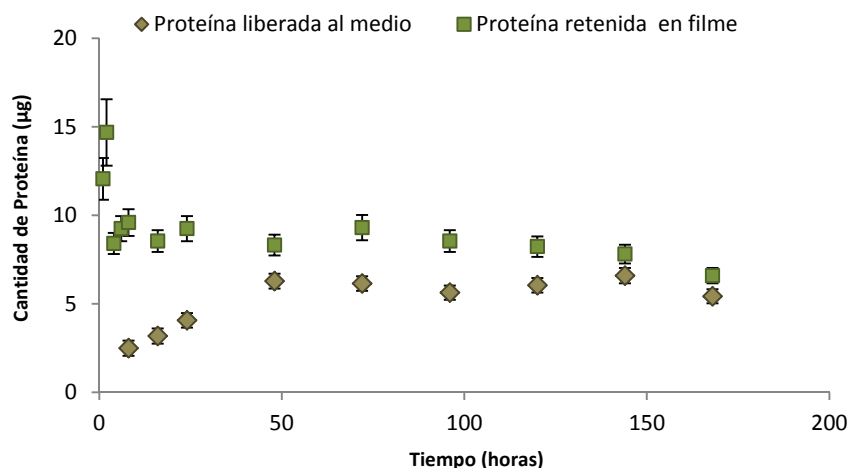


Figura 82. Cantidad de rhBMP-2 liberada desde filmes (Q11-0,25%) cargados con proteína (10 µg) y cantidad de proteína retenida por los mismos, no liberada, en función del tiempo.

Sin embargo, la suma de las cantidades de proteína presente en ambos medios (filme y medio de cultivo) está comprendida entre 11 y 14 µg.

Como se puede observar existe una discrepancia entre los valores de carga inicial de proteína en el filme y los valores obtenidos de la misma en los dos sistemas, filmes y medios. Una posible causa podría ser que no se llega a determinar toda la proteína presente en el filme, parte no se encuentra en contacto directo con la células sembradas aunque también hay que considerar, observando los valores obtenidos, las limitaciones existentes ya señaladas en el método de determinación de la proteína remanente o liberada.

Si se observa la curva dosis-respuesta mostrada en la Figura 80, la señal producida por cantidades importantes de proteína es prácticamente la misma, independientemente de la cantidad inicial existente en el filme como en el medio de liberación. Un aumento en la cantidad de proteína presente en el medio no se traduce en una mayor actividad ALP por parte de las células, ya que una vez activados todos los receptores celulares existentes, el exceso de proteína no conduce un efecto mayor, incluso, como se ha mencionado anteriormente, puede inhibirse la misma, de ahí que las cantidades de proteína detectadas en filmes y en los medios no coincidan.

Por otra parte, incluso aunque se produjera dicho aumento, la sensibilidad del instrumento no es capaz de detectarla, pues los valores de Abs_{405} son tan elevados que el detector está saturado y sólo diluciones muy grandes de la muestra, con su error asociado, pueden dar alguna indicación.

El problema, por tanto, es de difícil solución, pues en el caso de diluir se pierde la señal correspondiente a los valores más bajos de proteína, al igualarse al fondo, y sólo tendremos pues, valores aproximados en uno u otro rango de concentraciones.

Los análisis empleando diluciones se han efectuado para algunos de los experimentos realizados, pero no han aportado una mayor clarificación de los resultados pues la desviación estándar de los resultados aumenta en gran medida, hecho debido tanto a la mayor manipulación experimental, como a la posibilidad de tomar muestras más o menos enriquecidas en ALP, ya que ésta se puede concentrar en las membranas lisadas y una mayor proporción de membrana en una muestra que en su réplica produce resultados muy diferentes en estas diluciones como ya se señaló anteriormente.

Resultados similares a los ya descritos se producen cuando la carga del filme es aún mayor (20, 50 y 100 μg de rhBMP-2), aunque no obstante se pueden sacar algunas conclusiones que corroboran la explicación cualitativa proporcionada inicialmente (véase Figura 83).

Por ejemplo, la bajada inicial presente en el filme de 5 μg y aún visible en el de 10 μg , deja de existir para cargas mayores, donde se obtiene prácticamente una línea.

A medida que aumenta la carga de proteína inicial presente en los filmes, los resultados que se obtienen varían de forma concordante a la ya descrita. Si ésta es suficientemente grande no se observan diferencias en función del tiempo de liberación con respecto a la actividad observada en los filmes, pues siempre queda suficiente proteína para obtener el máximo de actividad, que según indican los resultados obtenidos para 20, 50 y 100 μg es de unos 15 μg aproximadamente.

En cambio, sí se observa alguna diferencia en los comportamientos derivados de los medios de liberación, aumentando considerablemente la proteína liberada a tiempo 1 hora con respecto a los valores de 10 μg , pasando de 1-2 μg en éste a unos 4 μg para carga de 20 μg y siendo de 5-6 μg para las cargas superiores de 50 y 100 μg . En estos dos últimos casos se obtiene también en tiempos superiores los valores de liberación de 15 μg , similares a los de remanencia en el filme. Este hecho nos indica claramente que no podemos distinguir valores superiores a éstos en las condiciones empleadas.

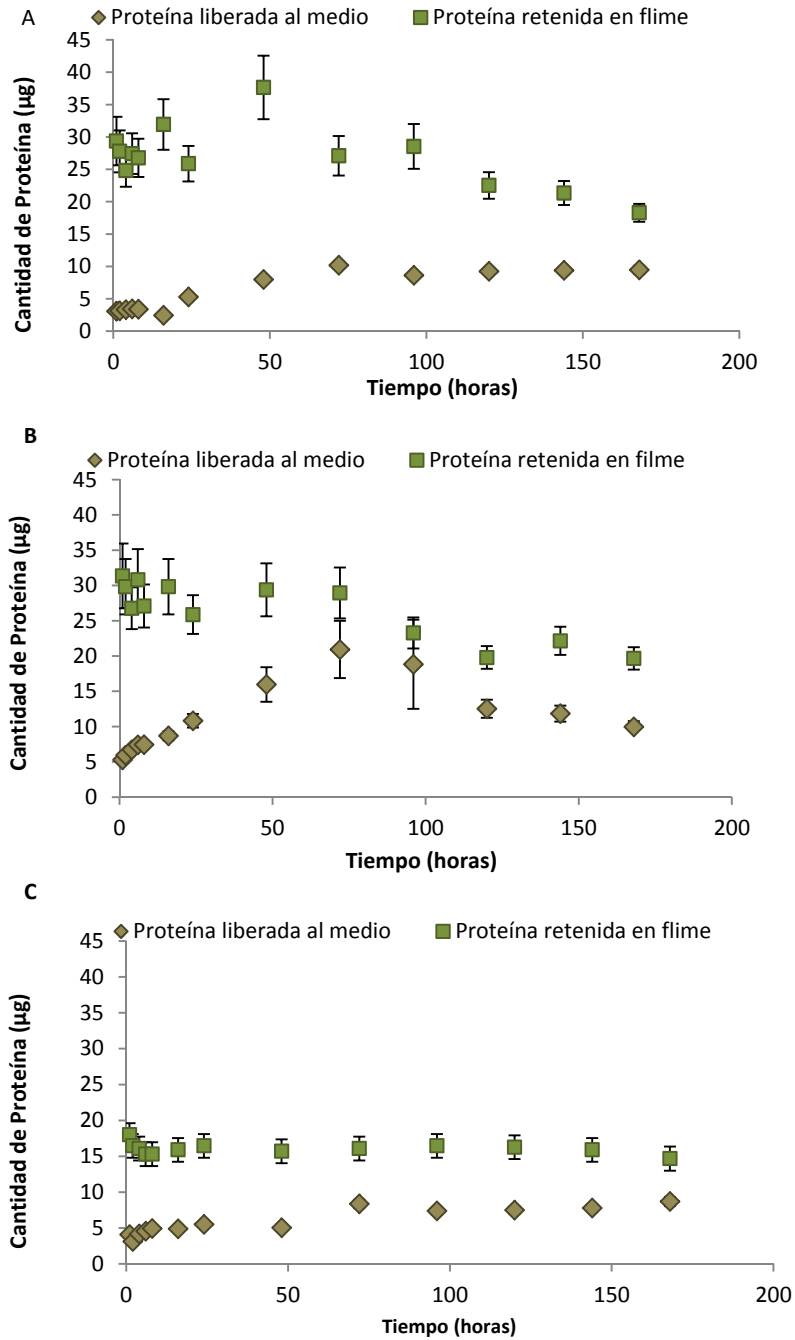


Figura 83. Cantidad de rhBMP-2 liberada desde filmes (Q11-0,25%) cargados con proteína (A: 20 µg; B: 50 µg; C: 100 µg) y cantidad de proteína retenida por los mismos (no liberada) en función del tiempo.

Aparte de las limitaciones ya señaladas, una representación de los valores de proteína, interpolados a partir de la curva dosis respuesta, para el medio en contacto con los filmes en función del tiempo, proporciona información relevante para el proceso. Tal representación se ofrece en la Figura 84.

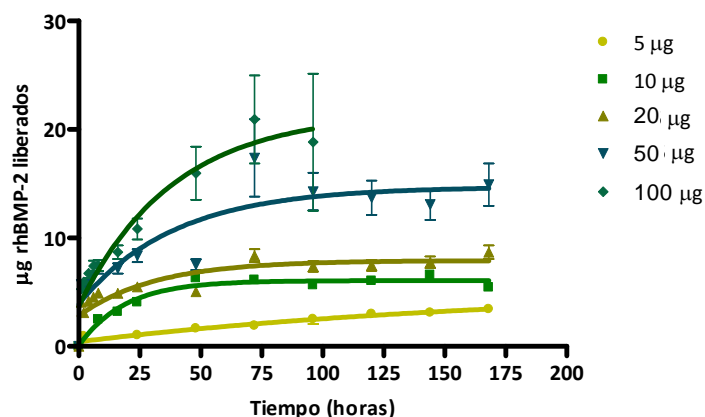


Figura 84. Representación de los ajustes de liberación de rhBMP-2 presente en los medios de liberación para todas las cargas iniciales de proteína en los filmes (5, 10, 20, 50 y 100 µg).

En ella se han ajustado los puntos experimentales a una ecuación del tipo:

$$Y=Y_0 + (\text{Plateau}-Y_0)*(1-e^{(-K*x)})$$

en la que se asume que a tiempo cero ya existe una liberación de proteína. Aunque el menor dato que disponemos corresponde a tiempo 1 hora, tal suposición es plausible puesto que el proceso de hinchamiento y liberación inicial ocurre en menos de 1 minuto, como se ha visto anteriormente. El valor de r^2 para los diferentes ajustes oscila entre 0,76 y 0,94 para el valor de carga inicial de 20 y 10 µg respectivamente.

En este punto se debe hacer un par de matizaciones. Aunque el ajuste realizado para la carga inicial de 5 µg presenta un r^2 de 0,88 para este modelo, una comparación de ajustes entre dicho modelo y uno lineal lleva a la conclusión con más de un 95% de confianza de que no se puede rechazar el modelo lineal, siendo éste el preferido. Este hecho concuerda con el que esta carga inicial de 5 µg, es la única que se libera completamente durante el tiempo de estudio determinado. En el resto de casos el modelo expuesto es el seleccionado como mejor ajuste frente a otros alternativos.

El segundo punto a señalar es que en el ajuste realizado para una carga de 100 µg se han eliminado los datos correspondientes a tiempos altos (superiores a 96 horas). Esta decisión se tomó porque en la actividad ALP determinada a través de la Abs_{405} se producía un fuerte descenso de ésta como consecuencia del hecho ya señalado de efectos inhibitorios producidos por la proteína cuando está presente en grandes cantidades, como se ha indicado en la curva dosis-respuesta (Liu *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2012). La inclusión de estos puntos en el

análisis nos llevaría a la conclusión de una disminución de la proteína liberada con el tiempo de exposición al medio de liberación, algo ilógico. La consecuencia de esta supresión es también que los parámetros cinéticos que se determinen están alterados, pues no se ha llegado en realidad al *plateau* supuesto en la ecuación.

En el fondo este hecho también afecta, aunque de forma menos evidente, al análisis correspondiente a la curva de 50 μg , pues los valores correspondientes a la meseta final están limitados por la sensibilidad del instrumento, y éste no es capaz de determinar de forma precisa valores de actividad ALP correspondientes a más de 15-20 μg de proteína.

No obstante lo anterior, y teniendo en cuenta que se deben tomar con cierta precaución los resultados, existe una interesante variación del tiempo de vida media obtenido de los ajustes anteriores. En la Figura 85 se representa éstos para las cargas superiores a 5 μg .

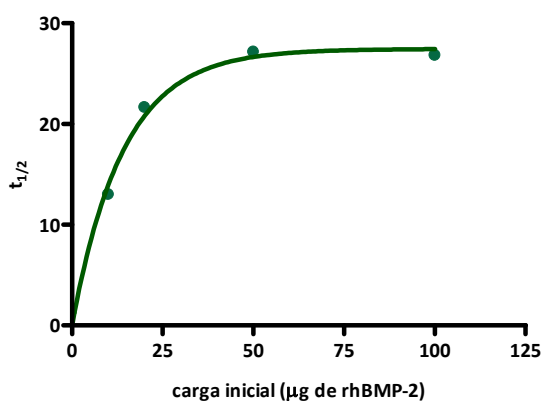


Figura 85. Representación de la vida media ($t_{1/2}$) en función de la carga inicial en el filme (excepto para filmes con 5 μg).

La variación que presenta dicho $t_{1/2}$ con la cantidad inicial de proteína (con la concentración inicial de la misma, pues al fin y al cabo el espesor del filme es idéntico en todos), indica que no se trata de un proceso cinético de orden 1. De hecho en la Figura 86 siguiente se muestra el ajuste de los $t_{1/2}$ frente a $1/c_0$, siendo c_0 la carga inicial del filme, junto con los intervalos de confianza del 95% para la recta ajustada ($r^2 = 0,984$).

El hecho anterior nos indica que, con las salvedades ya señaladas, los datos parecen mostrar una cinética más compleja de orden 2 en aquellos casos en los que la cantidad inicial de proteína presente en el medio es suficiente para mantener la liberación al medio durante el intervalo de tiempo estudiado.

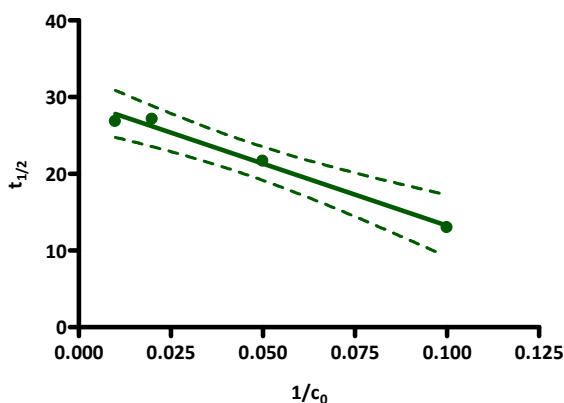


Figura 86. Representación de la vida media ($t_{1/2}$) en función de la carga inicial en el filme (excepto para filmes con 5 μg) frente al inverso de la concentración.

5.2. LIBERACIÓN DE LA PROTEÍNA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE QUITOSANO

Una vez observado el comportamiento que presenta un mismo tipo de filmes de quitosano activado con diferentes concentraciones de proteína, se decidió escoger una de ellas y emplear diferentes concentraciones de quitosano para estudiar en profundidad el efecto de la cantidad de quitosano en la liberación del factor.

Se escogió 10 μg como concentración de proteína a incluir en los filmes, la máxima concentración de rhBMP-2 que entra dentro del rango de medida de la curva de dosis respuesta, pues como hemos indicado en el aparato anterior, el método no permite distinguir cantidades superiores a 15 μg e incluso podríamos decir que 10 μg se encuentra en el límite superior de detección.

La comparación de las gráficas correspondientes a la cantidad de proteína remanente en el filme con las obtenidas para los medios de liberación parece indicar que, en todas ellas, la cantidad total de proteína obtenida a tiempos grandes (mayores de 48-72 horas), es decir, la suma de la proteína estimada remanente en los filmes y la presente en los medios, es de unos 11-14 μg . Lo que sí es claro es que un porcentaje importante de la misma queda retenida en el filme.

La cantidad retenida en el filme parece que disminuye al aumentar la concentración del mismo, es decir, parece que para filmes preparados con soluciones de quitosano de 0,1% y 0,25% se retienen aproximadamente un 90-80% de la proteína inicial puesta, mientras que en los del 0,5% y 0,75% retienen un 70-75% de la proteína y finalmente los del 1,0% sólo retienen como máximo un 60% de ésta. Es decir, como hemos dicho, la capacidad de liberación de esta proteína debería aumentar al aumentar la concentración del filme.

Por otra parte, esto está en franca contradicción con los resultados obtenidos para las cantidades de proteína presente en los medios de liberación puestos en contacto con los

filmes, donde se observa que la proteína liberada es de un 60% para los filmes de 0,1 y 0,25%, aproximadamente un 50-45% para los de 0,5 y 0,75% respectivamente y de sólo un 40% para los filmes del 1,0% (Figura 87).

Creemos que esta contradicción es sólo aparente. Parece que con una misma cantidad de proteína en todos los filmes (10 μg) las condiciones iniciales son las mismas para todos, pues estamos acostumbrados a pensar en los filmes como algo bidimensional, donde la densidad de proteína/ cm^2 es la misma en todos ellos. Si razonamos de esta forma está claro que no puede retenerse más en el filme del 0,1% que en el del 1,0%.

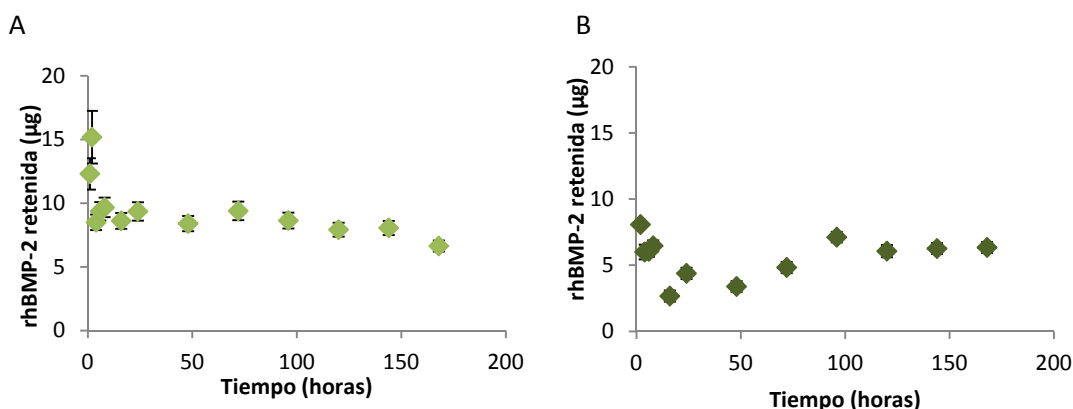


Figura 87. Cantidad de proteína retenida en los filmes de quitosano Q11, cargados inicialmente con 10 μg y preparados con diferentes concentraciones de polímero (A: 0,25% y B: 1,0%).

El error radica en atribuir a los filmes esa característica bidimensional exclusiva. En realidad, los filmes son tridimensionales, tienen un cierto volumen dado por el espesor del mismo, y éste depende fuertemente de la concentración del quitosano empleado. Este volumen es 10 veces mayor para los filmes del 1,0% que para los del 0,1%, lo que indica que la concentración volumétrica, y por tanto la superficial, en los filmes del 0,1% es de 10 veces mayor que la existente en los del 1,0%.

Hay que tener en cuenta que la cantidad de proteína que se determina es de forma indirecta, es decir, sembramos células sobre la superficie, y las células se activan dependiendo de la cantidad de proteína que se encuentran en ella. La mayor densidad de proteína hace que se produzcan mayores niveles de activación en la superficie de los filmes del 0,1% que en los del 1,0%, y se debe tener en cuenta que la curva dosis-respuesta es una curva sigmoide, por lo que pequeñas variaciones en la zona sigmoide producen grandes cambios en la respuesta. Es decir, la contradicción aparente tiene su explicación en la mayor densidad superficial en los filmes de menor concentración, que hace que sobreestimemos la cantidad total retenida en

los mismos.

Si analizamos a continuación los resultados obtenidos a partir de la cantidad de proteína existente en los medios de liberación, nos encontramos con resultados inicialmente mucho más coherentes. En la Figura 88 mostramos los resultados obtenidos para los diferentes espesores del Q11 estudiados en este apartado.

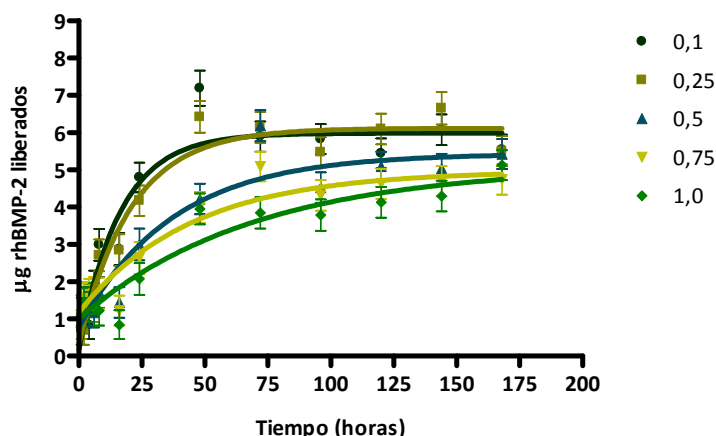


Figura 88. Cantidad de proteína determinada en los medios de liberación en función del tiempo con filmes preparados con diferentes concentraciones de polímero pero la misma carga de proteína (10 µg).

Se puede observar a simple vista en esta gráfica que los mayores niveles de liberación, y las cinéticas más rápidas para las mismas, corresponden a los filmes de menores concentraciones de quitosano, disminuyendo estos niveles y siendo la cinética más lenta a medida que aumenta el espesor del mismo.

Se realizó un ajuste no lineal de los datos al mismo modelo empleado en el apartado precedente, obteniéndose valores de r^2 comprendidos entre 0,87 y 0,93 para todos los casos. Los valores de $t_{1/2}$ determinados para las diferentes concentraciones de quitosano en los filmes se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de $t_{1/2}$ obtenidos de la cinéticas de liberación para cada una de las concentraciones de polímero empleadas en los filmes.

Concentración (%)	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
$t_{1/2}$	11,28	14,36	25,86	30,84	47,84

Como se puede ver, el espesor del filme influye de forma notable sobre el tiempo de vida media del proceso, así, los 10 μg de proteína se reducen a la mitad en unas 11-12 horas cuando el filme tiene una concentración de polímero del 0,1%, mientras que esa misma reducción en el filme del 1,0% necesita unos dos días aproximadamente. Este resultado creemos que puede tener una notable implicación práctica en los desarrollos necesarios para las aplicaciones buscadas.

Por otra parte, la dependencia del $t_{1/2}$ con la concentración es, en el fondo, una dependencia del mismo con la concentración efectiva, como se ha indicado al discutir los resultados obtenidos en el estudio precedente de la proteína retenida en los filmes. Si calculamos las concentraciones efectivas de proteína en cada uno de los filmes precedentes, empleando para ello el valor de espesor (Figura 37-A) y representamos gráficamente el tiempo de vida media en función de la concentración inicial de polímero en los filmes obtenemos la Figura 89-A.

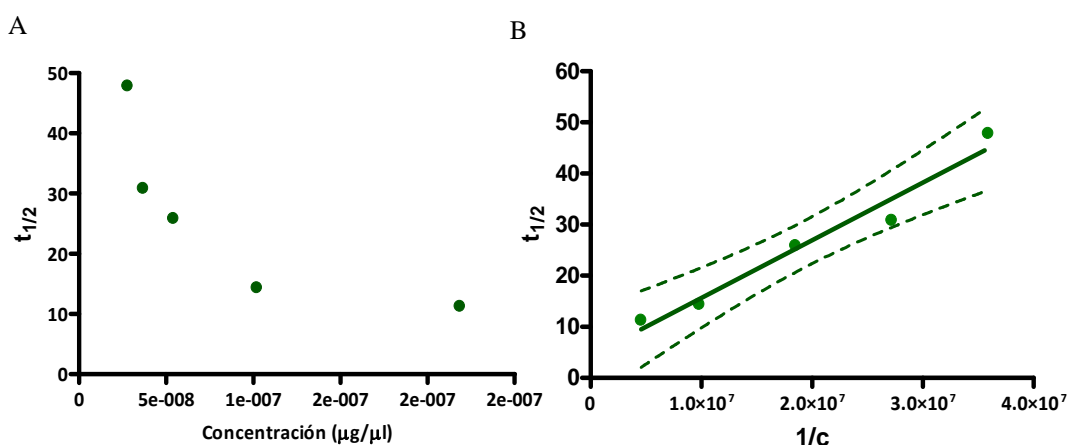


Figura 89. A) Representación del $t_{1/2}$ frente a las concentraciones efectivas de proteína para los filmes obtenidos con diferentes cantidades de polímero y misma carga de proteína (10 μg). B) Ajuste lineal del $t_{1/2}$ vs la inversa de la concentración inicial efectiva en cada filme.

La variación existente en los valores de $t_{1/2}$ con la concentración efectiva indica que el proceso global no se corresponde estrictamente a una cinética de primer orden. Por lo tanto, realizando una representación del $t_{1/2}$ frente a la inversa de la concentración efectiva se observa una relación lineal entre ambas variables, con un $r^2 = 0,963$, como se muestra en la Figura 89-B. Estos resultados indican por lo tanto que los datos experimentales son compatibles con una cinética de segundo orden.

5.3. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL QUITOSANO

Una vez estudiada la liberación en DMEM (a pH neutro) desde filmes de un mismo quitosano con diferentes concentraciones de polímero y proteína, se decidió evaluar la influencia de los diferentes factores fisicoquímicos de los quitosanos en el proceso de liberación de la rhBMP-2 al medio.

Para ello se estudió de la liberación de la rhBMP2 empleando cinco quitosanos que diferían en sus valores de Mw y DD (y que mostraban perfiles de degradación *in vitro* diferentes).

En este estudio se emplearon los quitosanos Q1, Q4, Q9, Q11 y Q12 como representantes de los grupos de quitosanos ya establecidos. Los filmes fueron preparados al 0,25% con una concentración de rhBMP-2 de 20 $\mu\text{g}/\text{filme}$ para poder observar más claramente la actividad ALP.

Los valores de rugosidad y espesor de los filmes son similares para todos ellos ya que están preparados a bajas concentraciones de polímero, siendo Sa menor de 300 nm y el espesor de 2 μm .

En la Figura 90 se muestra el comportamiento de dos quitosanos Q1 y Q4, con mayor y el menor Mw respectivamente. Como se puede ver los resultados son muy similares a los descritos previamente. Se produce una bajada inicial de la proteína remanente en el filme, o en la superficie del filme siendo más precisos, y accesible a las células sembradas sobre el mismo.

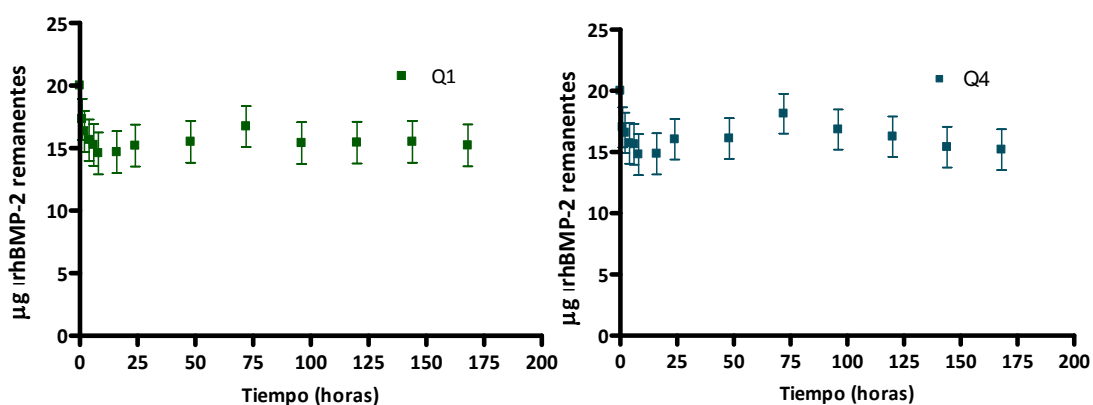


Figura 90. Cantidad de proteína remanente en los filmes de dos quitosanos (Q1 y Q4 al 0,25%) y con la misma cantidad de proteína inicial (20 μg).

Esta disminución se produce en los períodos de tiempo iniciales hasta las 24 horas aproximadamente, observándose a continuación un aumento de la actividad ALP detectada, lo que implica también un aumento en la cantidad de proteína superficial. En este apartado, como en los precedentes, se aplican las mismas precisiones realizadas sobre la interpolación de la Abs_{405} en la curva dosis-respuesta.

Un hecho llamativo en los resultados es que el nivel de disminución de la proteína remanente en las primeras 24 horas depende del quitosano empleado. Esto se puede observar en la Figura 91 siguiente, donde se muestra una ampliación de esa zona temporal junto con los ajustes correspondientes a una caída exponencial de una fase.

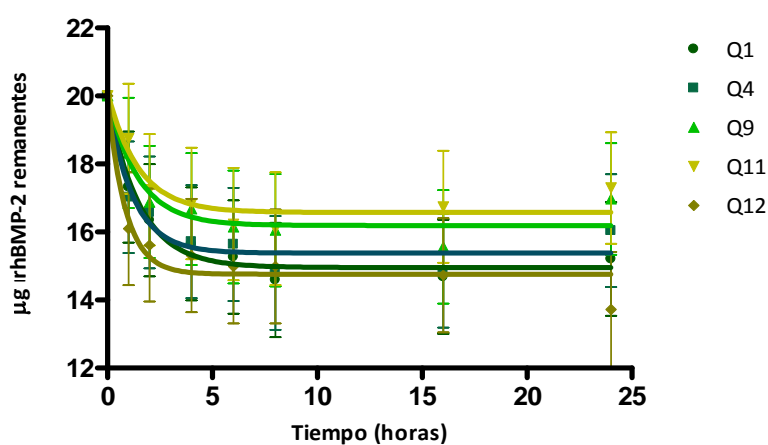


Figura 91. Cantidad de proteína rhBMP-2 presente en los filmes durante las primeras 24h de los quitosanos (0,25%) y cargados con la misma cantidad de proteína (20 µg).

Aunque los coeficientes de correlación r^2 de los ajustes obtenidos están comprendidos entre 0,45 y 0,62, los test de replicados para detectar la falta de ajuste dan como resultado la adecuación del modelo a los datos experimentales.

Un hecho interesante en el ajuste realizado radica en los contrastes de hipótesis posteriores donde se testea la hipótesis nula “todas las curvas pueden compartir el mismo *plateau* frente a que cada quitosano presenta un valor final diferente en estos tiempos, obteniéndose como resultado con nivel del 99% de confianza el rechazo de la hipótesis nula. Si se analiza con más detalle estos resultados, se encuentra que éste parámetro es el único que impide ajustar una curva global, las hipótesis similares acerca de Y_0 o acerca de K proporcionan el no rechazo de las correspondientes hipótesis nulas “ Y_0 es global” o “ K es global”. Aunque no se pueden sacar conclusiones seguras acerca de los datos, sí es importante señalar que parece existir diferencias en cuanto a la liberación producida por los distintos tipos de filmes.

Finalmente, existe una gran diferencia en el comportamiento de dos quitosanos prácticamente idénticos en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas excepto en el grado de desacetilación, Q11 y Q12, que presentan la mayor diferencia entre los niveles del *plateau* de los diferentes quitosanos estudiados, según se observa en la Figura 91 ya presentada. No obstante estos hechos se habrán de interpretar más correctamente con los resultados de los medios de liberación, que abordamos a continuación.

Observando los medios de liberación a partir de diferentes tipos de quitosanos, destaca de forma llamativa la liberación casi total e inmediata de la proteína contenida en el filme de Q1. Examinando los datos (Figura 92) se observa que prácticamente desde la primera hora de contacto la cantidad liberada permanece constante. El valor exacto es difícil de determinar. En este caso se han hecho diferentes determinaciones, usando tanto los datos originales como los obtenidos al diluir cuatro veces. En ambos casos se obtuvieron prácticamente líneas horizontales, pero correspondientes a diferentes valores de cantidad de proteína.

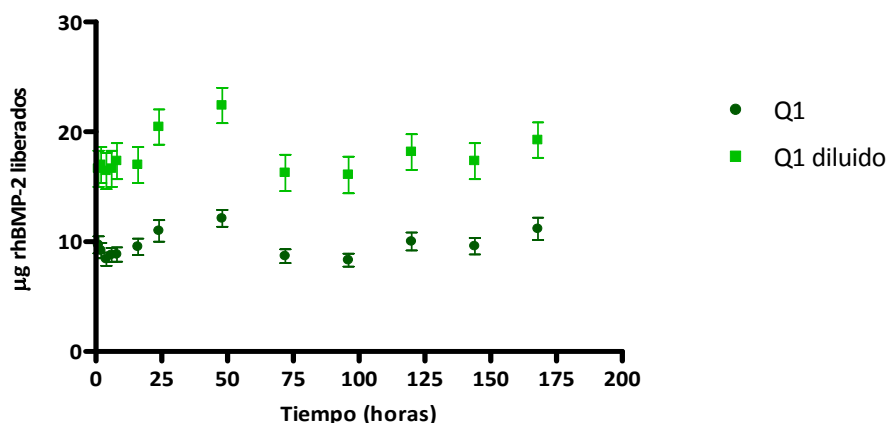


Figura 92. Determinación de la cantidad de proteína liberada en los medios con filmes de quitosano Q1 (0,25%) cargados con 20 µg de factor. Debido a la saturación del detector y a las limitaciones de la técnica, se muestra a modo de ejemplo, los valores obtenidos al diluir cuatro veces los mismos

El hecho es que prácticamente no se detecta un aumento de la cantidad de proteína con el tiempo de contacto del medio con el filme, liberándose además gran cantidad de proteína, al menos por encima de 10 µg de rhBMP-2. También los resultados de los filmes de Q1 muestran una rápida liberación, habiéndose alcanzado en 8 horas el valor límite del *plateau* de la disminución inicial. Estos dos hechos indican que existe una liberación muy rápida en este quitosano, y la liberación de una gran cantidad de proteína, que es imposible cuantificar de forma exacta con este método, al menos cuando la cantidad está en el límite superior de la curva dosis-respuesta, tanto más cuanto más elevada sea la dosis liberada.

De los tres grupos en los que se han clasificado los quitosanos el primero, representado por el Q1, corresponde a quitosanos de elevado Mw, donde el número de cadenas constituyentes del filme es menor que en los otros casos. Por lo tanto, la liberación de la proteína tiene lugar mediante una cinética demasiado rápida para su determinación con esta metodología.

De forma cualitativa los valores medidos para el resto de quitosanos coinciden con lo descrito para los filmes. En estos casos sí se observa una cinética de liberación coherente durante toda la duración del experimento siendo los ajustes considerablemente mejores (r^2 entre 0,86 y 0,92). Es interesante señalar que los datos experimentales se sitúan en el entorno de 5 μg de proteína, donde los errores cometidos en las interpolaciones son menores (Véase la Tabla 11).

Tabla 11. Parámetros obtenidos de los ajustes de las cinéticas de liberación de la proteína al medio.

Quitosanos	Q4	Q9	Q11	Q12
Y0	0,147	0,389	0,104	0,101
Plateau	6,78	4,872	4,552.	5,309
K	1,006	0,5203	1,030	0,8693
$t_{1/2}$	0,6887	1,332	0,66728	0,7973

Como se observa en la Figura 93, las liberaciones presentadas por los quitosanos de Mw intermedio y bajo (Q4, Q9, Q11 y Q12) son muy similares entre sí. De hecho un análisis estadístico de los parámetros implicados en el ajuste exponencial indica que todos los quitosanos comparten la misma constante de velocidad, $K=0,8673$ y $t_{1/2}$ de 0,79.

Lo más llamativo en este análisis es que los niveles máximos de liberación alcanzados son diferentes para cada quitosano, destacando el Q4 como el quitosano que presenta una mayor liberación. Por último destacar también la diferencia existente entre el Q11 y el Q12, quitosanos prácticamente idénticos excepto en el DD, siendo la liberación final mayor en el caso del Q12

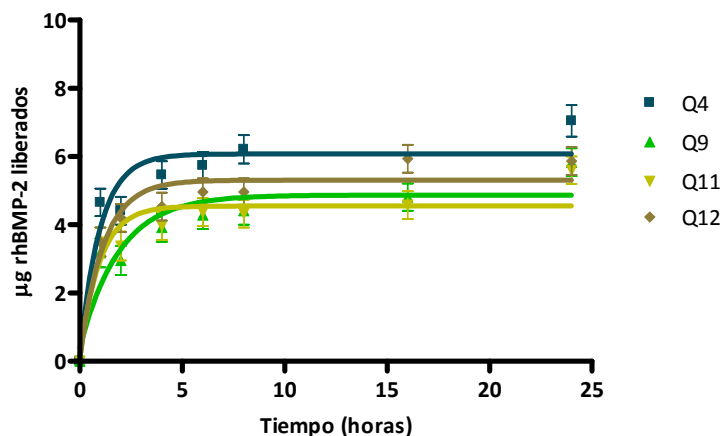


Figura 93. Cantidad de proteína presente en los medios de liberación a partir de quitosanos diferentes a una misma concentración (0,25 %) y una misma cantidad de proteína (20 µg).

Como resumen de lo expuesto en este apartado final de los estudios *in vitro* podemos señalar lo siguiente:

En los estudios de liberación se ha determinado la cantidad de proteína liberada a través de medidas indirectas. La determinación realizada es la medida de la actividad ALP inducida en la línea celular C2C12 por acción de la rhBMP-2, de forma que todas las cantidades de proteína liberada se han obtenido a través de una interpolación en la curva dosis respuesta de las células a esta proteína.

Se ha evaluado tanto la proteína liberada al medio de cultivo como la retenida en los filmes a través de esta metodología, obteniéndose únicamente información cuantitativa de la proteína liberada al medio. Una conclusión general que se obtiene independientemente del experimento realizado es que la actividad de la proteína se mantiene activa durante todo el tiempo de experimento (realizado a 37°C).

En todos los casos se pudo ajustar la liberación a un proceso exponencial, de una sola constante de tiempo, en el caso de menor dosis de proteína, los datos también son compatibles con un proceso lineal (5 µg). Parece que la liberación inicial, efecto “burst”, es fuertemente dependiente de la carga del filme.

Una conclusión general que se obtiene independientemente del experimento realizado es que la actividad de la proteína incluida en los filmes se mantiene activa durante todo el tiempo de experimento (realizado a 37°C durante de 11 días).

Una representación del $t_{1/2}$ con la carga inicial indica que no se trata de un proceso cinético de orden uno, de hecho los datos son compatibles con una cinética de liberación de

segundo orden, ya que una representación del tiempo de vida media frente al inverso de la carga inicial se ajusta a una línea recta.

Cuando se analiza la liberación de la proteína con una carga inicial constante pero distintas concentraciones de filmes, se observa que independientemente de la concentración se puede ajustar de la misma forma que en el caso anterior a una liberación exponencial de una sola constante de tiempo (K).

Si calculamos la concentración efectiva de proteína para cada una de las concentraciones de quitosano, y se representa el tiempo de vida media obtenido en el análisis anterior frente a la inversa de esta concentración efectiva, se obtiene de nuevo una relación lineal indicando que los datos son compatibles con una cinética de segundo orden.

Cuando se utilizan quitosanos de distinta naturaleza con la misma carga inicial, todas las cinéticas de liberación se ajustan a una exponencial de una constante de tiempo, excepto en quitosanos de Mw alto (Q1) donde la liberación es extremadamente rápida.

A pesar de la incertidumbre en los datos de liberación de los distintos quitosanos de Mw intermedio y bajo, y la similitud de los espesores de todos los filmes, el ajuste conjunto indica que comparten la misma constante de velocidad y por lo tanto el mismo valor $t_{1/2}$.

6. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS FILMES: ESTUDIOS *IN VIVO*

La degradación *in vivo* de los filmes de quitosano cursa con la convergencia de dos procesos descritos anteriormente para los ensayos *in vitro*. Por una parte tiene lugar un proceso de redisolución y degradación en medio ácido, ya que en los estadíos tempranos de la curación de una herida existe un proceso inflamatorio, de duración variable en función del tejido dañado y del tamaño del defecto. Dicha inflamación transcurre en condiciones de hipoxia, lo que se traduce en valores de pH ligeramente ácidos (Liu *et al.*, 2004; Freier *et al.*, 2005).

Por otra parte, existe un proceso de degradación enzimática favorecido por la fase inflamatoria anteriormente señalada, en el que participan numerosos tipos celulares como células polimorfonucleares, neutrófilos, macrófagos, leucocitos, etc, que producen un aumento de enzimas lisosómicas secretadas por las mismas, encargadas de degradar de forma inespecífica el filme de quitosano.

En este trabajo se han realizado dos aproximaciones diferentes para la caracterización del comportamiento *in vivo* de los filmes de quitosano desarrollados, tanto en el aspecto de degradación *per se* tras su implantación como en el de su uso como agente transportador de la rhBMP-2.

Estas aproximaciones las podemos dividir en dos grandes grupos, una de ellas basada exclusivamente en el análisis histológico de las muestras retiradas, que constituyen los experimentos que se describen a continuación, y otras en las que se ha realizado un seguimiento no invasivo de los procesos en estudio. En particular se han empleado técnicas de μ -CT o técnicas de marcaje radioactivo con ^{125}I , para evaluar los procesos relacionados con el uso de los filmes como transportadores de rhBMP-2, que constituyen los estudios finales de este trabajo.

6.1. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LA DEGRADACION DE FILMES Y FORMACIÓN DE HUESO

Los experimentos *in vivo* preliminares para el estudio de la degradación de los filmes, mediante implantación directa de los mismos en ambos lados de la columna vertebral, presentaron algunos inconvenientes en su realización. El principal radicó en la localización exacta de la muestra y su recuperación del tejido tras la cirugía.

Para evitar este inconveniente y asegurarse así la extracción y recuperación únicamente de la zona muscular con el inserto, se diseñaron bastidores de resina (POM-C) de uso frecuente en odontología, biocompatible y no tóxica, en los que se colocaban los filmes previamente a su implantación, lo que facilitó enormemente el reconocimiento de la zona tisular en contacto con los mismos.

No obstante, aunque esta aproximación resolvió la localización y recuperación de la muestra, produjo inconvenientes inesperados como se mostrará al comentar los resultados. Debido a ello se optó, en los estudios posteriores realizados, por una solución intermedia entre las dos opciones previas señaladas. En ella se procede a la implantación directa de los filmes de quitosano en la localización anatómica deseada, colocándose un pequeño testigo del material POM-C que se utiliza para la señalización de la posición quirúrgica y posterior retirada del tejido tras el sacrificio del sujeto experimental.

Se han realizado tres tipos de estudios experimentales *in vivo* de los filmes de quitosano con técnicas histológicas:

- Evaluar la biodegradación temporal de un filme de quitosano (Q11) a una concentración determinada (0,25%). En este estudio el filme se encontraba insertado en un bastidor y se analizaron los experimentos a diferentes tiempos post implantación (3, 7, 21 y 42 días) mediante la tinción de HE.
- Evaluar la degradación de los diferentes quitosanos empleados en esta Memoria (Q1 a Q12) a una concentración (0,25%) en un sólo punto temporal (42 días). Las condiciones

de colocación de la muestra y las tinciones realizadas fueron similares a las empleadas en el estudio anterior.

- Evaluar la actividad osteoinductora de hueso ectópico de los filmes desarrollados como portadores de rhBMP-2. Se utilizó de nuevo un sólo tipo de quitosano (Q11-1,0%) empleando diferentes cantidades de rhBMP-2 (10, 20 y 100 µg) a 21 días post-implantación. Las condiciones de colocación de las muestras fueron similares a los anteriores estudios y las tinciones histológicas empleadas en este caso fueron HE y TCM (específica de hueso).

En todos los casos en el momento de la extracción y/o recuperación de las muestras se realizó un estudio descriptivo sobre el estado de la herida así como del tejido adyacente.

En general no se encontraron signos de inflamación anormales (diferentes del proceso de cicatrización normal en este tipo de heridas) ni de rechazo, ni hubo síntomas de infección, presencia de pus o tejido necrosado con los diferentes quitosanos y tiempos empleados en los distintos estudios.

En todas las cirugías el aspecto de las heridas en las muestras con filmes de quitosano fue similar al presentado en los controles, ya sea de sólo bastidor o de control quirúrgico (solo incisión y posterior sutura de los diferentes planos quirúrgicos). En la Figura 94 siguiente se ofrece una imagen del tipo de muestras de tejido obtenidas para su posterior análisis histológico.

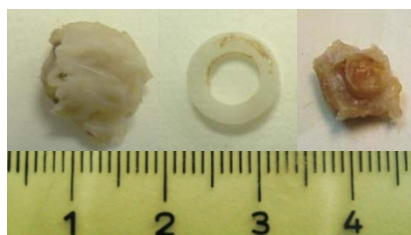


Figura 94. Imagen que muestra de izquierda a derecha, una muestra extraída a los 7 días de tejido muscular de rata tras su fijación en PFA (4%), el bastidor sin muestra y el tejido a analizar.

6.1.1. Degradación de un filme en función del tiempo

Como hemos indicado previamente se implantó un filme de quitosano Q11 (0,25%) a ambos lados de la columna vertebral en dos ratas (n=2) y en una de ellas se insertó un bastidor control, es decir sin filme. Tras tres días de la cirugía, se sacrificó el animal y se recuperaron las muestras. Una vez teñidas y analizadas se pudo observar, como se muestra en la Figura 95, la presencia casi completa del filme, cuya estructura permanece bastante íntegra y completa.

Dicho filme de quitosano no presentaba signos de degradación ni de integración en el tejido. No se observó presencia celular en su superficie ni en su interior, y el tejido adyacente mostró una diversidad celular similar al control (Figura 95-D) distinguiendo tejido conectivo laxo, fibras musculares y tejido adiposo.

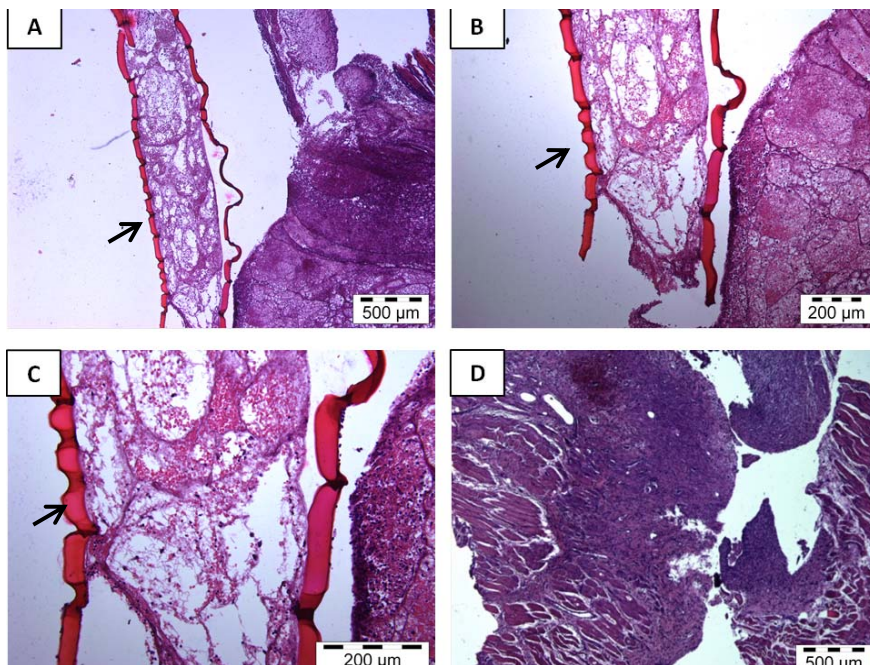


Figura 95. Tinción de HE de la degradación del filme de Q11 (0,25%) a los 3 días de post-cirugía. En rojo se reconoce la estructura del filme (flecha negra) rodeado de tejido conectivo. Las imágenes A-C muestran diferentes aumentos (10x, 20x y 40x) y D es el control (bastidor sin filme, 10x).

Los resultados obtenidos a los 7 días post-implantación se ofrecen en la Figura 96. Como se puede observar, se pudo localizar el filme con suma facilidad, encontrándose más disgregado, fragmentado y disperso por toda la muestra que en el caso anterior. El control mostró un estado muy similar al presentado en la Figura 95 estando constituido fundamentalmente por fibras musculares y tejido conjuntivo.

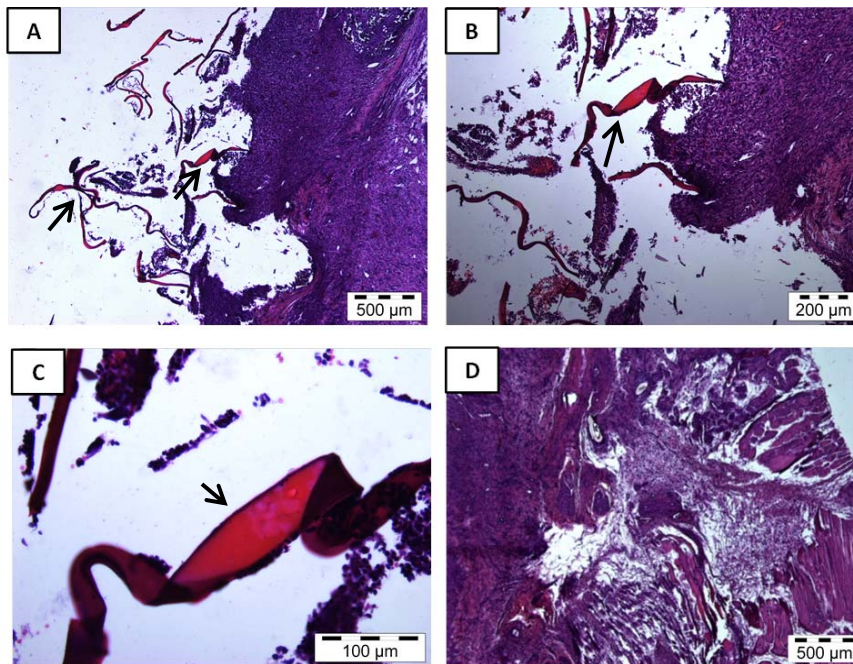


Figura 96. Tinción de HE de la degradación del filme de Q11 (0,25%) a los 7 días de post-cirugía. En rojo se reconoce la estructura del filme (flecha negra) rodeado de tejido conectivo. Las imágenes A-C muestran diferentes aumentos (10x, 20x y 40x) y D es el control (bastidor sin filme, 10x).

A los 21 días post-cirugía (Figura 97) se observan fragmentos de filme, presentando un grado de disgregación-degradación bastante elevado comparado con los mostrados a los 3 y 7 días. El filme aunque sigue estando presente, muestra una integración completa con el tejido adyacente sin observarse de forma evidente, en la inmensa mayoría de los cortes obtenidos, ningún efecto de aislamiento.

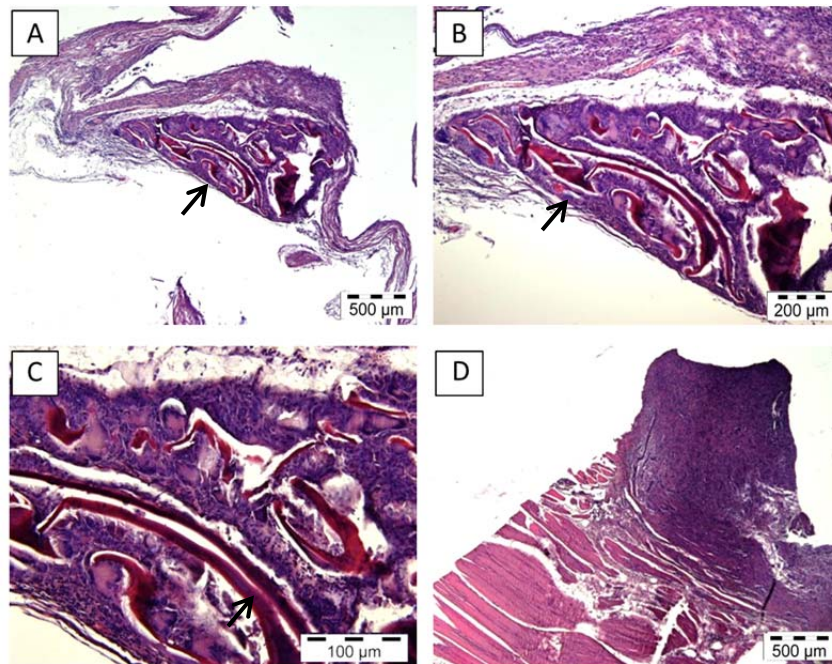


Figura 97. Tinción de HE de la degradación del filme de Q11 (0,25%) a los 21 días de post-cirugía. En rojo se reconoce la estructura del filme (flecha negra). Las Imágenes A-C muestran diferentes aumentos (10x, 20x y 40x) y D es el control (bastidor sin filme, 10x).

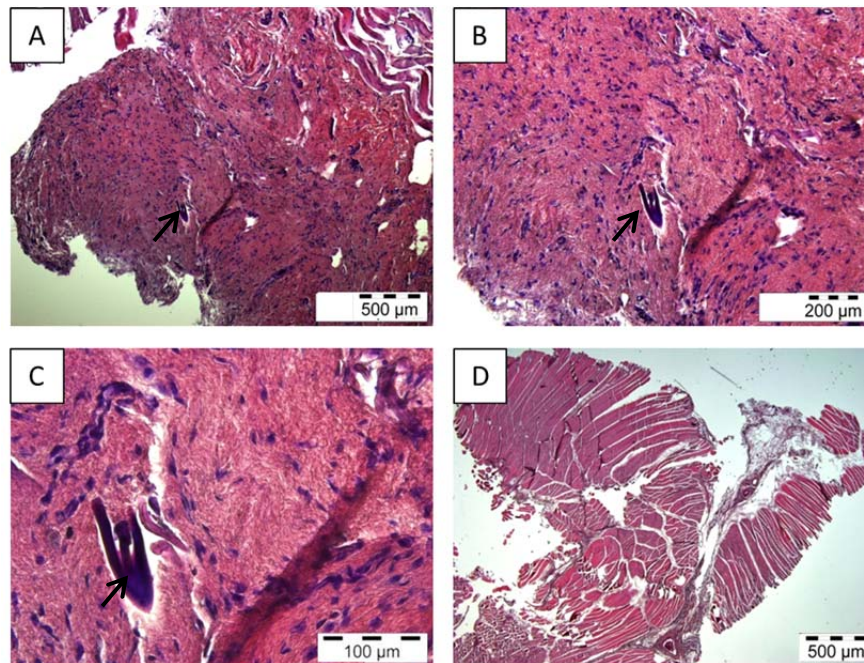


Figura 98. Tinción de HE de la degradación del filme de Q11 (0,25%) a los 42 días de post-cirugía. En morado se reconoce la estructura del filme (flecha negra). Las Imágenes A-C muestran diferentes aumentos (10x, 20x y 40x) y D es el control (bastidor sin filme, 10x).

Finalmente la Figura 98 muestra los resultados obtenidos tras 6 semanas de implantación *in vivo*. Como se puede observar en ella la presencia del filme se ve muy reducida, apenas existente, y es difícil de localizar a excepción de pequeños fragmentos totalmente integrados en el tejido.

Un hecho que se observa desde prácticamente el inicio del ensayo se muestra en la Figura 99. En ella se aprecian fragmentos del filme englobados en un espacio vacío rodeado de tejido conjuntivo más o menos desorganizado. Este hecho se empieza a observar a partir de los 7 días y es prácticamente inexistente a las 6 semanas. Se observa la evolución temporal del proceso de aislamiento y degradación con el tiempo de implantación de los filmes hasta su total degradación e integración con el tejido circundante.

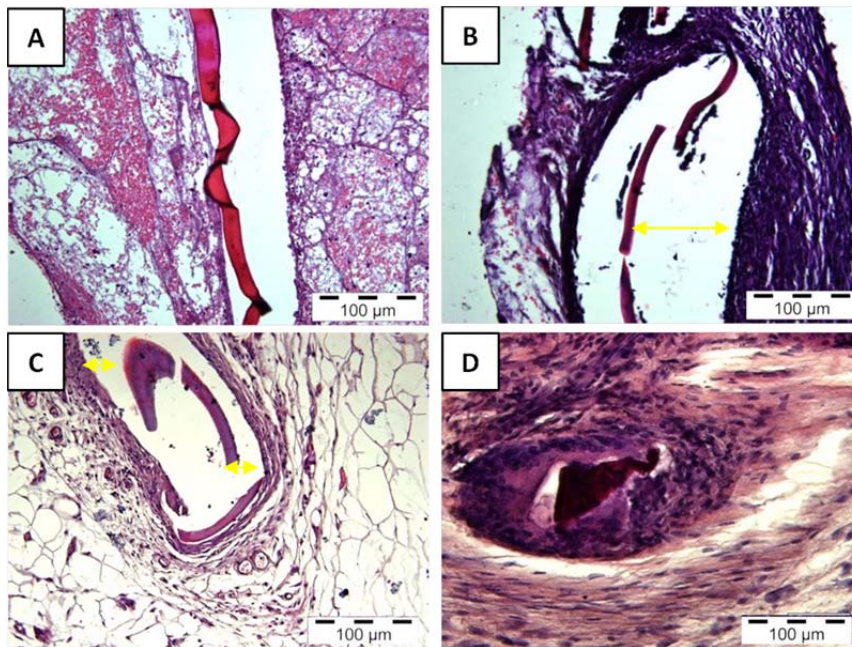


Figura 99. Tinción de HE del efecto de aislamiento del filme en función del tiempo. La imagen A, B, C y D corresponde a 3, 7, 21 y 42 días tras la operación. Las flechas amarillas marcan la distancia del filme al tejido que lo rodea, disminuyendo hasta los 42 días donde el filme se muestra integrado con el tejido.

Estudios *in vitro* realizados en nuestro grupo de trabajo, mostraron que las células C2C12 sembradas sobre este tipo de filmes sobreexpresan genes relacionados con la respuesta inmune y la respuesta a un estímulo externo (estímulo químico, herida o de un cuerpo extraño) pudiendo explicar el comportamiento de encapsulación observado en la figura anterior (Abarrategi *et al.*, 2009).

Otro elemento a tener en cuenta en este fenómeno es el efecto del propio bastidor de localización que dificulta un contacto inicial adecuado del tejido circundante con el filme de

quitosano, creándose a tiempos cortos un espacio de aire entre tejido y filme (Figura 100) que puede aumentar el efecto de aislamiento de los fragmentos de filme.

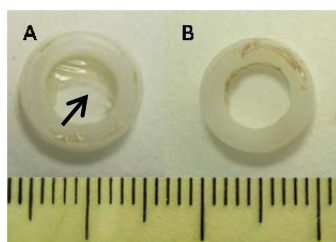


Figura 100. Bastidores retirados tras 3 (A) y 21 días (B) de implantación. Es visible la presencia de filme en el bastidor a tiempos cortos (3 días) y la ausencia de filme pasado los 21 días post-cirugía.

Si resumimos el conjunto de fenómenos observados en la degradación *in vivo* de los filmes de quitosano Q11 (0,25%) a lo largo del tiempo, se tendrá que señalar la existencia de diferentes procesos concurrentes en el estudio realizado, lo que dificulta parcialmente la comprensión real del mismo. De hecho se puede distinguir 3 fenómenos diferentes:

- inflamación de origen quirúrgico,
- respuesta inflamatoria de cuerpo extraño,
- y fragmentación, degradación e integración del filme.

La primera de ellas es algo inherente a la misma cirugía realizada y no suele cursar con más de dos tres días de existencia en este tipo de cirugía, por lo que no produce fenómenos de encapsulación como se puede observar en las imágenes.

La respuesta inflamatoria a cuerpo extraño suele ser común a muchos de los diferentes materiales implantados de origen artificial (Tomihata y Ikada, 1997) pues se pone en contacto al organismo con un material que no ha reconocido como propio a lo largo de la evolución. Este es el caso del polímero POM-C empleado, así como del propio quitosano, que aun siendo de origen natural no se encuentra presente como tal en los mamíferos.

Ambos biomateriales empleados son biocompatibles, ya que no producen efectos adversos en las células, sin embargo en el caso del POM-C no se trata de un material biodegradable y su integración en el tejido difiere de la integración del biopolímero. Se ha observado que es un material fácil de separar del tejido, lo que es indicativo de su escasa integración tal y como se muestra en la Figura 100. La respuesta inflamatoria a este material no se detecta en la zona muscular de implantación, como se ha podido observar en las imágenes D ofrecidas en las figuras previas (95-98) correspondientes a los distintos puntos temporales.

No obstante se ha descrito en la literatura (Gyawali, 2009) que la implantación subcutánea en ratas para un material POM-C diseñado para ingeniería de tejidos, cursa con

una encapsulación inicial, cápsula que desaparece lentamente en un plazo de 3-4 semanas.

Este hecho puede ser la razón tanto de la presencia de tejido conectivo laxo en algunas imágenes y los grandes espacios de encapsulación inicial del propio quitosano, como se muestra en la Figura 99.

Independientemente de lo expuesto, también se ha descrito para el quitosano la existencia de respuesta de cuerpo extraño en su implantación *in vivo* por parte de algunos autores (Muzzarelli *et al.*, 1994), aunque no en la forma física de filmes con el tratamiento empleado en este trabajo. El carácter biodegradable del quitosano, origina en este proceso glucosaminas y N acetil glucosaminas, componentes propios de la ECM.

En la Figura 99, se puede observar la disminución progresiva en el tiempo del tamaño de los fragmentos de quitosano, hasta su prácticamente total desaparición e integración en el tejido (Imagen D de la misma figura).

A pesar de esta respuesta inicial de cuerpo extraño, con encapsulación mediada asimismo por la respuesta al bastidor de POM-C, la adaptación de los filmes insertados en el organismo hospedador se puede observar más claramente en la Figura 101 donde se muestran los resultados anteriores enfocándonos en el proceso de adhesión y proliferación celular en estos filmes insertados, por los tejidos y células adyacentes.

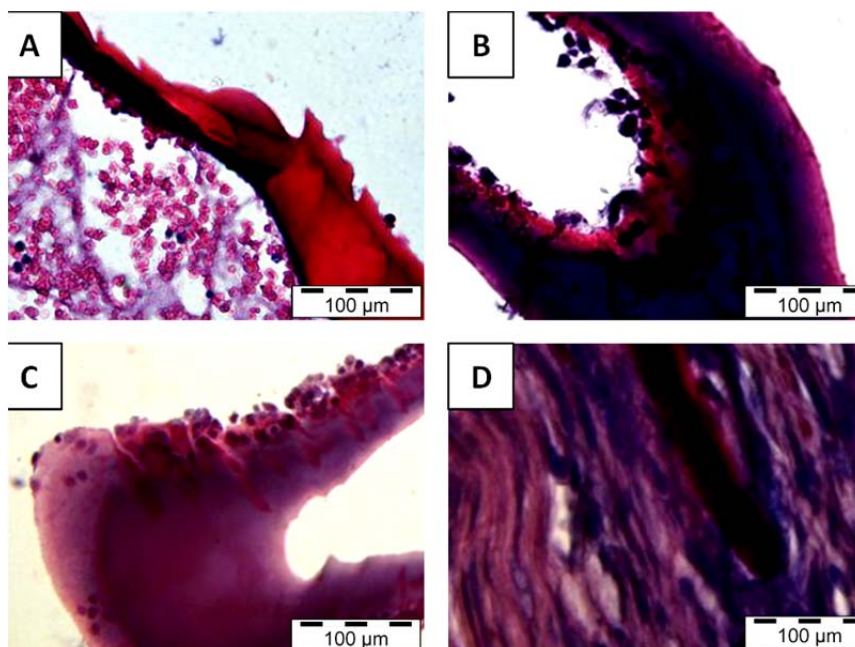


Figura 101. Tinción de HE de la colonización celular sobre los filmes de quitosano. Se aprecia un aumento de la presencia celular sobre los filmes a medida que están más tiempo en contacto con el tejido, produciendo un cambio de color del filme de rojo intenso a morado oscuro. En este proceso se aprecia un aumento de la fragmentación y degradación del filme insertado.

En general a los 3 días se localiza el filme de forma sencilla apareciendo una estructura completa en color rojo intenso, debido a la Eosina (colorante ácido, que tiñe estructuras básicas como por ejemplo el citoplasma celular) y observándose un contacto inicial de las células del tejido adyacente. Transcurridos 7 días se puede constatar que aumentan los contactos celulares en la superficie del filme, observando presencia celular sobre los filmes a ese tiempo de estudio. A las 3 semanas post- cirugía se observa incluso células en su interior las cuales pueden incrementar la fragmentación y degradación del filme. En este punto temporal es más difícil localizar los fragmentos del filme ya que se encuentra más integrado en el tejido. Finalmente a las 6 semanas el filme ha desaparecido casi en su totalidad, obteniéndose muchos cortes histológicos donde no se detecta, e incluso en los que es posible distinguir fragmentos de menor tamaño con una colonización celular completa, estado previo a su desaparición.

6.1.2. Degradación de diferentes quitosanos a 42 días

Del estudio realizado anteriormente de la degradación temporal del quitosano Q11 se seleccionó el tiempo de 42 días como el más adecuado para la comparación del comportamiento frente a la biodegradación de los diferentes quitosanos. A dicho tiempo la presencia de filme de Q11 fue escasa, por lo tanto se podrán observar mejor las posibles diferencias entre los quitosanos.

El procedimiento quirúrgico realizado fue similar a la empleada en el apartado 6.1.1, insertando dos bastidores con filme a ambos lados de la columna vertebral y empleando por lo tanto un animal para dos quitosanos diferentes (n=1).

Se trata pues sólo de un estudio preliminar del impacto que las diferentes características fisicoquímicas de cada quitosano generan en la degradación *in vivo*.

Los resultados obtenidos para los distintos filmes de quitosano se muestran en la Figura 102 y como se puede apreciar fácilmente las imágenes muestran diferencias llamativas entre ellos.

Tanto el Q9 o el Q11, representativos de quitosanos de Mw bajo e intermedio, mostraron fragmentos de menor tamaño, difíciles de apreciar, indicando una mayor integración con el tejido. En cambio el Q1 y Q7 revelan una estructura prácticamente intacta del filme, mostrando un proceso de degradación menor al final del ensayo. Parece observarse la existencia de cierta influencia del Mw en la degradación *in vivo* de los quitosanos, aunque este hecho se habrá de corroborar en experimentos futuros con un mayor tamaño de muestra.

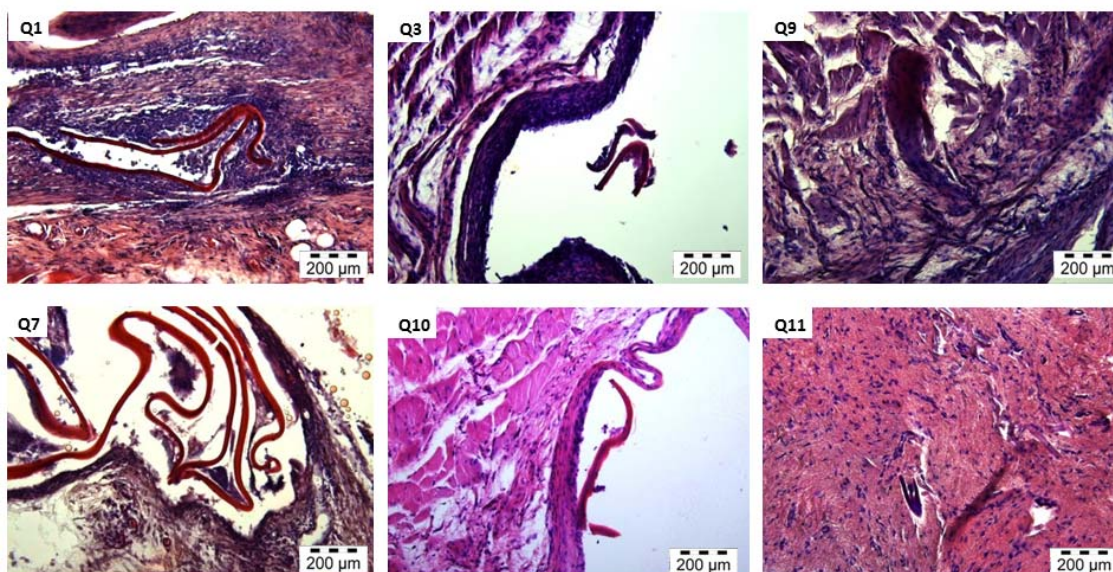


Figura 102. Imágenes correspondientes a la tinción de HE de la degradación de los diferentes tipos de filme tras 42 días post cirugía. Cada quitosano se ha nombrado con su número correspondiente.

El DD es otro factor influyente en el proceso de degradación *in vivo* sin embargo debido al escaso tamaño de muestra no se pueden obtener resultados concluyentes.

6.1.3. Actividad osteoinductora de hueso ectópico de los filmes con rhBMP-2

La aplicación fundamental de los filmes de quitosano evaluados en el presente trabajo es su uso como agentes transportadores de rhBMP-2. Se encuentra descrito ampliamente en la literatura que la rhBMP2 es capaz de formar hueso fuera del tejido óseo, es decir, lo que se conoce como hueso ectópico.

Este fenómeno nos permite evaluar de forma indirecta la liberación *in vivo* de la proteína en tejido muscular. Aunque estos experimentos se han realizado ya con éxito por el Grupo de Trabajo en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, siempre se habían realizado con el filme formado sobre una superficie metálica, por lo que era imposible realizar cortes histológicos para evaluar qué sucedía con el filme transportador en estos procesos. Para comprobar ambos aspectos se decidió realizar experimentos con un solo quitosano (Q11) a la misma concentración empleada en estudios anteriores realizados en el Grupo (1,0%) y con tres cantidades de factor, 10, 20 y 100 µg de rhBMP-2.

En este caso, dados los problemas encontrados con el bastidor empleado en los experimentos anteriores, se decidió modificar la técnica quirúrgica usando como señalizador del lugar de implantación una pequeña pieza de POM-C, colocada sobre el mismo una vez

suturado el plano muscular. El estudio se realizó a los 21 días post-cirugía, donde se observó fácilmente la presencia del filme en los estudios mostrados previamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 103 ofrecida a continuación.

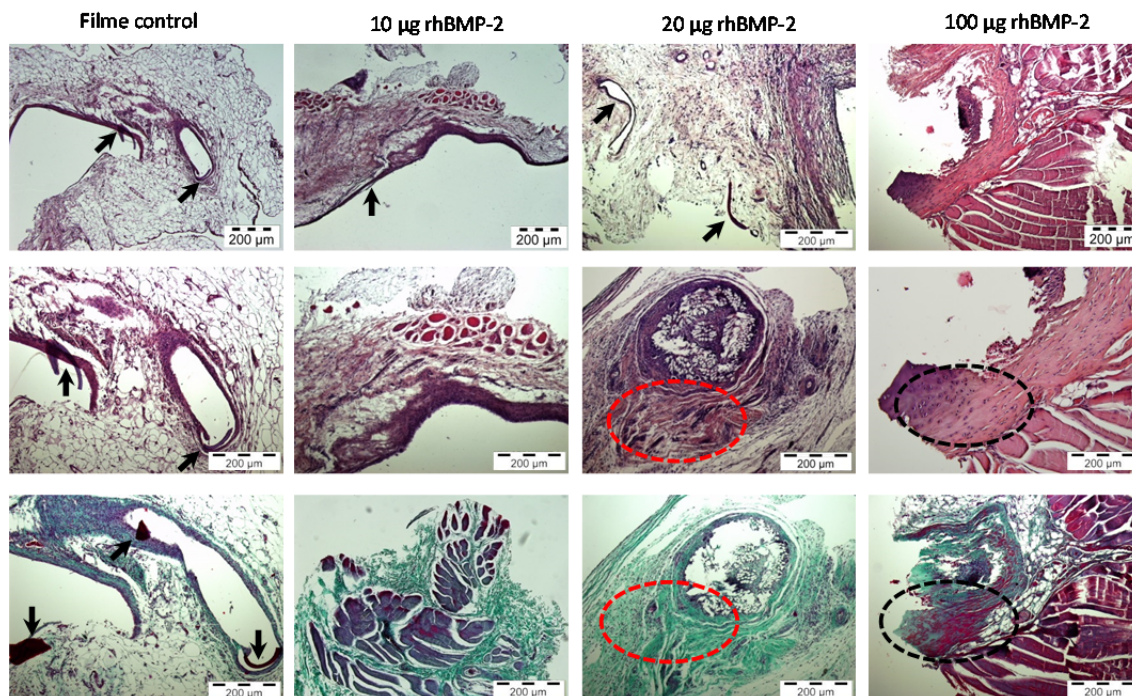


Figura 103. Imágenes de HE (en las filas superiores) y TCM (en la fila inferior) de filmes de Q11 (1,0%) con diferentes cantidades de proteína rhBMP-2 a los 21 días de la post-cirugía. Las flechas negras indican presencia del filme, los círculos rojos punteados muestran la formación de vasos, fibras colágenas y matriz ósea y por último los círculos negros marcan el tejido óseo *de novo*.

Se pueden señalar diferentes hechos llamativos en los resultados mostrados. Por una parte, si nos centramos en el filme control sin rhBMP-2, se puede apreciar claramente la existencia de fragmentos de filmes relativamente grandes y algo más aislados en este punto temporal, comparado con los mostrados previamente en el estudio de degradación temporal del Q11. La razón de esta diferencia radica en la diferente concentración de los filmes empleados en este estudio, 1,0% frente al 0,25%. Según lo esperado, mayores cantidades de polímero en el filme llevan asociados mayores tiempos de residencia en el organismo, como se observa en esta Figura 103.

Por otra parte, si comparamos esta imagen del filme control con las obtenidas en presencia de diferentes cantidades de proteína, es importante señalar que, a medida que aumenta la cantidad de proteína incorporada en el filme, disminuye el tamaño de los

fragmentos detectables de quitosano, hasta desaparecer totalmente en el filme con 100 µg de rhBMP-2.

Finalmente, si nos centramos en la tinción específica de hueso (TCM) mostrada en la fila inferior de la Figura 103, se puede observar un notable aumento de la matriz colágena apreciable a medida que se incrementa la cantidad de rhBMP-2 presente, de forma que es posible detectar verdadera estructura ósea madura (Véase la Figura 104).

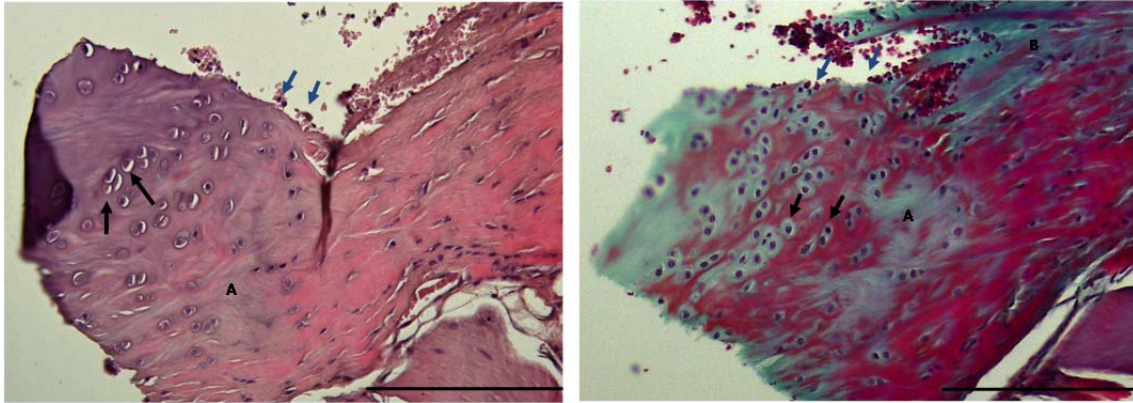


Figura 104. Ampliación de la imagen obtenida mediante tinción de HE y TCM del filme cargado con 100 µg de proteína, (escala 200 µm) visualizándose los osteocitos (flecha negra) en el interior de las lagunas, y osteoblastos (flechas azules) rodeados nuevo tejido óseo (A) y de fibras de colágeno (B).

Como consecuencia de estas observaciones se puede afirmar que el tiempo de degradación del transportador cargado con proteína cambia de forma visible, disminuyendo su residencia en el organismo debido a que la presencia de agentes bioactivos, modificando de forma drástica tanto la actividad metabólica como el tipo celular presente en el entorno del soporte.

En este caso, aún tratándose de filmes con una concentración muy superior de quitosano a los estudiados previamente, su tiempo de degradación disminuye notablemente no detectándose restos de filmes a 21 días, mientras que en el caso estudiado previamente era necesario el transcurso de 42 días para mostrar una degradación similar.

6.2. SEGUIMIENTO DE LA FORMACIÓN DE HUESO ECTÓPICO MEDIANTE TÉCNICAS NO INVASIVAS

A pesar de la importante información que proporcionan las técnicas histológicas realizadas en el apartado anterior, en relación tanto a la degradación del transportador como al proceso de formación de nuevo tejido óseo inducido por la liberación de la proteína rhBMP-2, son técnicas de uso frecuente que presentan algunos inconvenientes.

Estos inconvenientes se centran en la técnica de análisis en sí, con lo que conlleva de trabajo tedioso y de larga duración, debido a la dificultad de localizar el sitio exacto del implante, la obtención de numerosos cortes y su consiguiente tinción y estudio. Además de ser técnicas que requieren el sacrificio del animal para la obtención de datos, lo que obliga a un cierto número de sujetos experimentales para obtener información de los procesos temporales, como es en nuestro caso la formación de hueso ectópico.

Debido a ello se decidió el empleo de técnicas no invasivas, que nos permiten obtener datos y realizar un seguimiento temporal de un mismo sujeto experimental sin necesidad de su sacrificio. Existen un gran número de técnicas que permiten mantener el organismo vivo y aportar resultados con suficiente resolución espacial para obtener la información necesaria sobre los procesos biológicos de estudio.

En nuestro caso, se optó por el uso de la μ -CT realizada en la Unidad de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar de la UCM. Se trata de una técnica de elección para este tipo de tejido relativamente económica, asequible y de fácil visualización. Con ella se ha podido evaluar y apreciar el inicio de la aparición de nuevo tejido, la evolución del mismo durante 6 semanas e incluso la desaparición del mismo.

6.2.1. Liberación de diferentes concentraciones de proteína

La técnica quirúrgica realizada para la implantación de los filmes de quitosano activados con rhBMP-2 fue similar a la descrita en el apartado anterior, empleando en este caso filmes de quitosano Q9 a una sola concentración (1,0%), activados con diferentes cantidades de rhBMP-2 (10, 20 y 100 μ g) e implantado filmes idénticos en ambos lomos del animal. Una vez realizada la operación se realizaron μ -CT semanales a partir de la segunda semana post-cirugía.

En la Figura 105 se ofrecen los resultados obtenidos mediante μ -CT correspondientes a la cantidad de 20 μ g de rhBMP-2 por filme. En ella se aprecia la formación de nuevo tejido óseo en ambos lados de la columna, siendo llamativo la detección de nuevo tejido desde la segunda semana post-implantación (zona señalada por el cruce de los marcadores).

Ambos lados, derecho e izquierdo, presentan ciertas diferencias tanto en el tiempo de aparición como en la intensidad y el volumen a lo largo del estudio. No obstante parte de estas diferencias se centran en la dificultad de introducir los filmes de manera homogénea en el saco muscular, ya que en contacto con los fluidos corporales los filmes se contraen, hecho que influye en la liberación de la proteína y en la morfología de la señal observada mediante μ -CT.

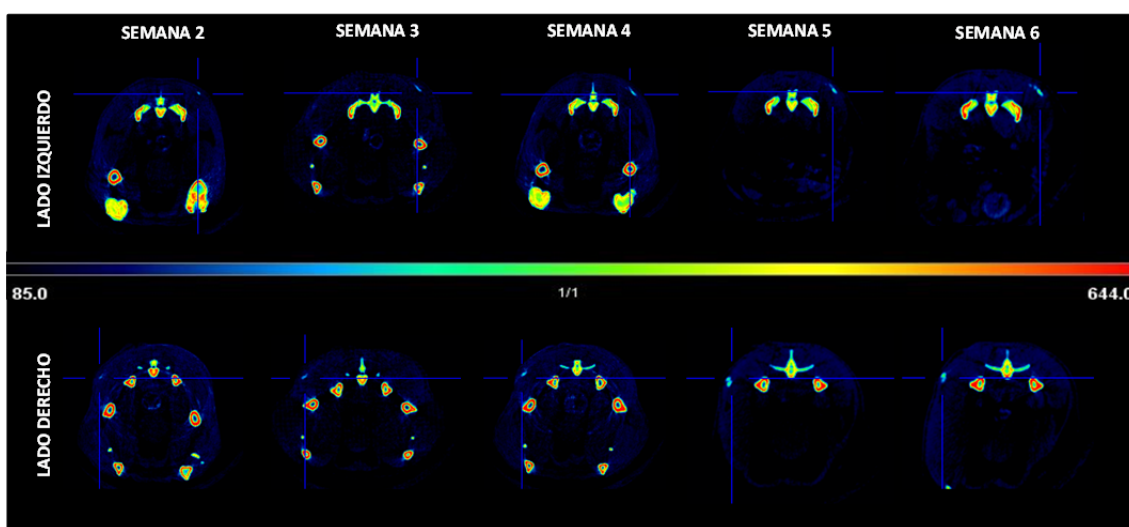


Figura 105. Imágenes de μ -CT de la formación de nuevo tejido óseo ectópico en función del tiempo para una misma concentración de proteína rhBMP-2 en el filme (20 μ g). La intersección de los dos ejes indica la localización de la muestra. Escala en unidades Hounsfield (85-644 HU).

Con menores concentraciones de proteína (10 μ g) se pudo apreciar en el lado izquierdo un retraso adicional en la aparición de la señal (detectándose solamente a partir de la tercera semana) en cambio en el lado derecho fue prácticamente inapreciable durante todo el tiempo de estudio. (Véase Figura 106).

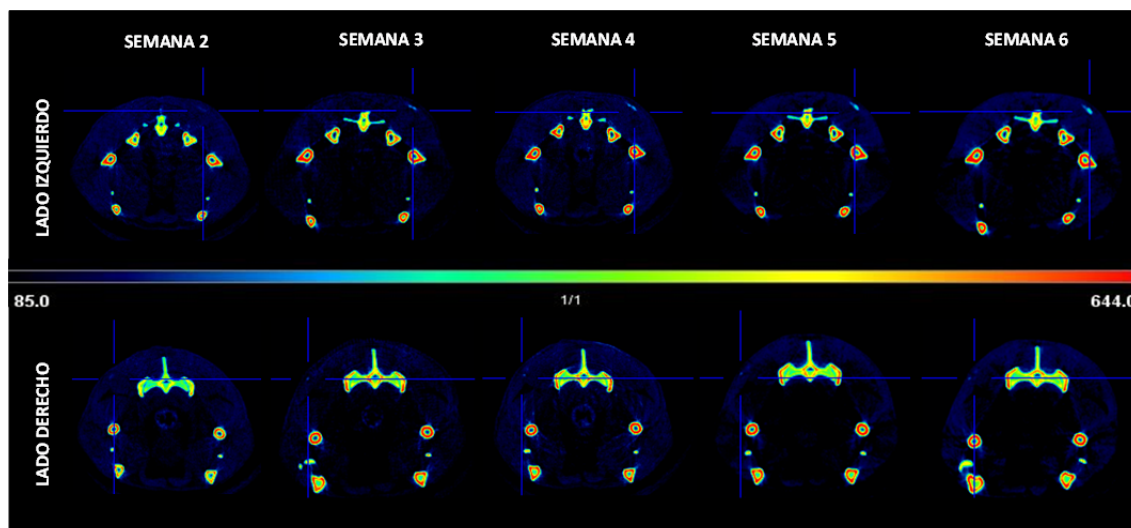


Figura 106. Imágenes de μ -CT de la formación de nuevo tejido óseo ectópico en función del tiempo para una misma concentración de proteína rhBMP-2 en el filme (10 μ g). La intersección de los dos ejes indica localización de la muestra. Escala de unidades Hounsfield (85-644 HU).

Con el uso de mayores concentraciones (100 μ g de proteína) es de esperar una mayor intensidad y volumen de la señal correspondiente al tejido óseo *de novo* y tal vez una aparición más temprana en el tiempo. Este último hecho sin embargo no se corrobora con los datos experimentales donde no se aprecia señal alguna a la segunda semana de estudio y es a partir de la tercera donde se encuentra una señal de gran volumen e intensidad en ambos lados de la columna que perdura en el tiempo (Véase Figura 107).

Este efecto se debe muy probablemente a que una mayor cantidad de proteína no conduce a una formación de hueso anterior en el tiempo, y aunque la liberación sea de mayor cantidad al medio, el tejido adyacente requiere de un tiempo determinado (similar en todas las concentraciones) para responder al efecto osteogénico de la proteína.

Es decir se precisa de un tiempo mínimo para que tenga lugar la migración de células mesenquimales a la herida, la diferenciación de las mismas mediante la unión de la proteína a los receptores celulares y el desencadenamiento de la cascada de señales que conducen a la expresión de marcadores óseos y a la formación de matriz ósea en el sitio del implante. Además, se ha descrito en bibliografía que cantidades elevadas de proteína también pueden estimular la resorción de hueso, pudiendo ralentizar la creación de nuevo tejido.

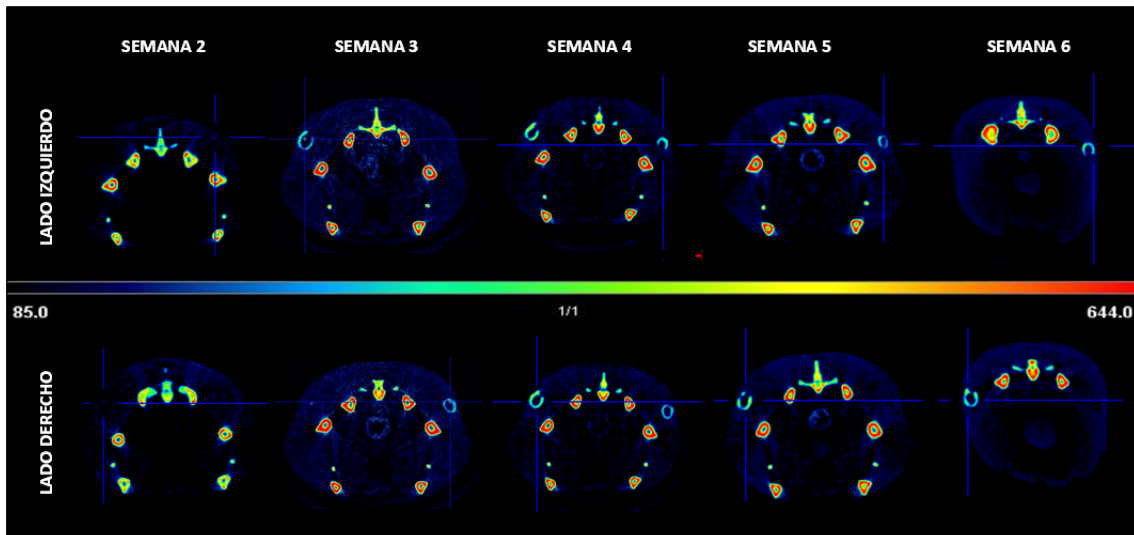


Figura 107. Imágenes de μ -CT de la formación de nuevo tejido óseo ectópico en función del tiempo para una misma concentración de proteína rhBMP-2 en el filme ($100 \mu\text{g}$). La intersección de los dos ejes indica la localización de la muestra. Escala en unidades Hounsfield (85 a 644 HU).

A modo comparativo se muestra en la siguiente Figura 108, las imágenes obtenidas a la sexta semana de estudio (42 días) en función de las diferentes concentraciones de proteína en el filme. Como se puede apreciar, la intensidad y el volumen de la señal varían en función de la cantidad de factor incluida en el filme y su liberación al medio, produciendo una señal diferente debido a la distinta cantidad de nuevo tejido óseo ectópico inducido.

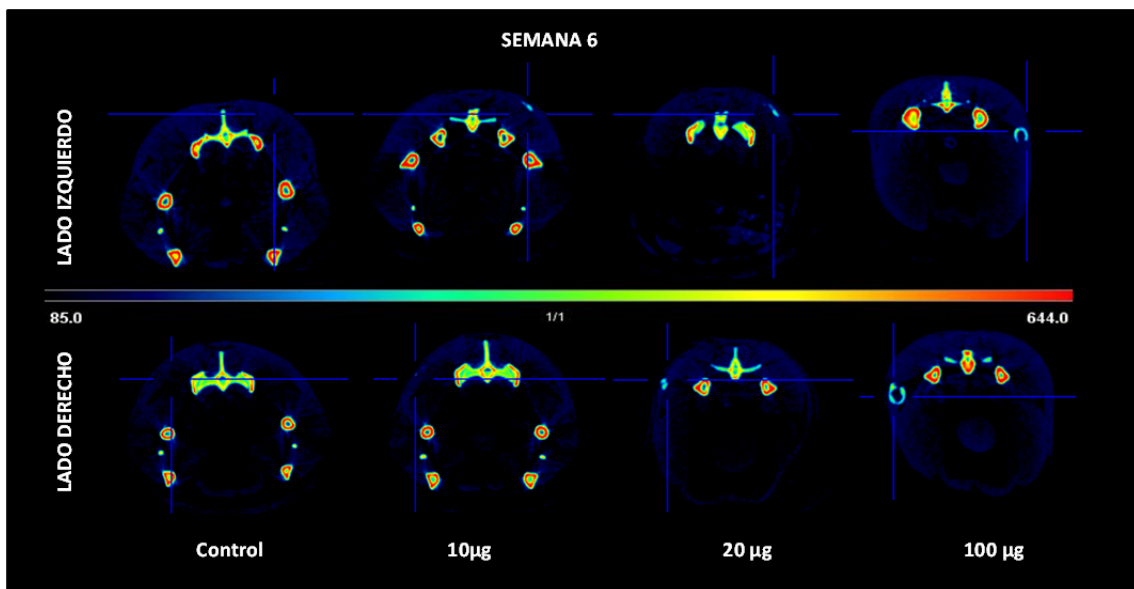


Figura 108. Imágenes de μ -CT de la evolución de la formación de nuevo tejido óseo ectópico en función de la concentración de proteína rhBMP2 a las 6 semanas post cirugía.

La Figura 109 siguiente ofrece una reconstrucción 3D realizada mediante el programa Volview 3.0 a partir de los datos obtenidos de la muestra con 20 μg de proteína desde la tercera hasta la sexta semana.

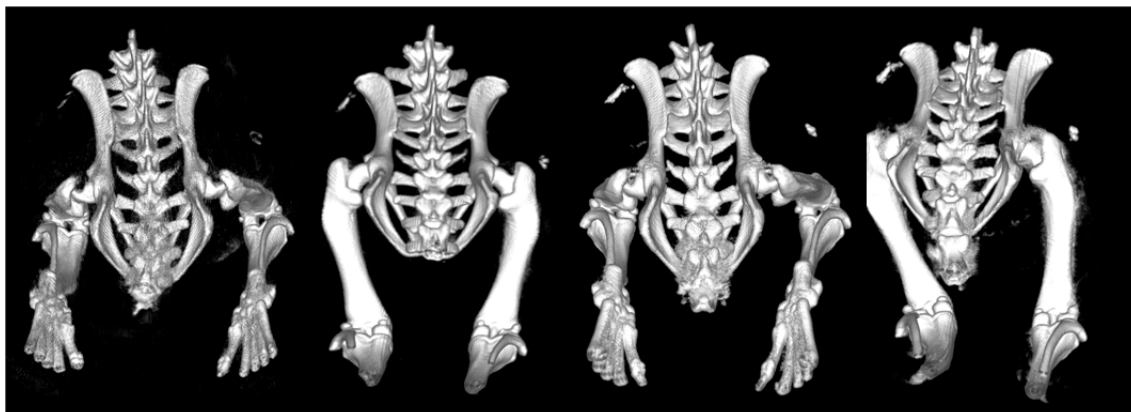


Figura 109. Reconstrucción 3D mediante el Programa Volview 3.0 de la formación de nuevo tejido óseo ectópico para una misma concentración de proteína en el filme (20 μg) hasta la sexta semana post-cirugía.

Las imágenes obtenidas mediante el programa Pmod 3.0 nos permitieron también cuantificar el volumen y la intensidad de la señal correspondiente al nuevo tejido formado para cada condición. La siguiente Figura 110 muestra los resultados de la cuantificación del volumen por la intensidad de las muestras con 10, 20 y 100 μg de proteína en función del tiempo.

A simple vista se observa un aumento de la señal obtenida en función de la dosis de factor presente en los filmes y del tiempo de implantación. En el caso de los filmes cargados con 100 μg de proteína, se observa una señal bastante estable (tanto del volumen obtenido como de la intensidad registrada) independientemente de la semana de estudio, es decir, alcanzando una señal similar desde prácticamente la tercera semana.

En cambio los filmes con menor cantidad de factor (10 y 20 μg) muestran un aumento progresivo de la señal en el tiempo, estando claramente relacionado el volumen máximo de intensidad con la carga inicial de proteína presente en el filme.

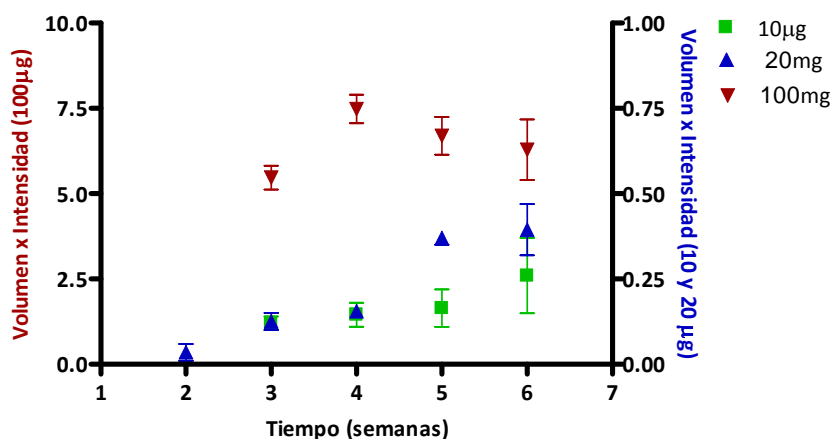


Figura 110. Estudio de la formación de hueso mediante la determinación del volumen de interés (VOI) por la intensidad de la señal empleando 10, 20 y 100 µg de proteína.

Por otra parte, se decidió evaluar el efecto de las diferentes características fisicoquímicas (principalmente Mw) en la formación de nuevo tejido óseo ectópico, ya que la degradación del transportador sí se encuentra influenciada por dicho parámetro.

6.2.1. Liberación desde diferentes filmes de quitosano

Para ello se seleccionaron tres quitosanos, diferentes en Mw y DD (Q1, Q5 y Q9) preparados a una concentración (0,5%) y con 100 µg de proteína rhBMP-2, con el fin de evaluar el comportamiento *in vivo* de cada transportador y estudiar así el impacto de las diferentes características fisicoquímicas en la formación de nuevo tejido óseo.

La cirugía se estableció siguiendo el mismo procedimiento experimental que en ensayos anteriores. Los resultados mostrados en la Figura 111 fueron obtenidos a lo largo del ensayo, siendo muy llamativas las diferencias existentes en el comportamiento de los tres quitosanos empleados.

El Q5, de Mw intermedio y DD del 82%, mostró las características fisicoquímicas más adecuadas para este fin formando la mayor cantidad de tejido óseo *in vivo*.

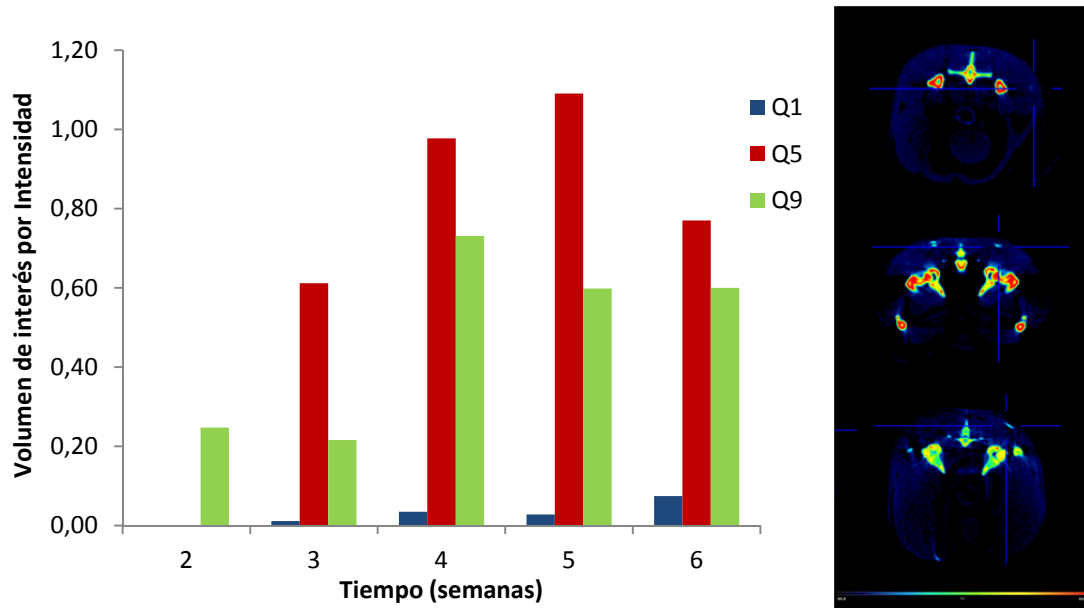


Figura 111. Estudio de la formación de hueso mediante el empleo de tres quitosano diferentes. Q1, Q5 y Q9 a una misma concentración (0,5%) hasta la sexta semana. A la derecha se presentan a modo de ejemplo, las imágenes obtenidas en la sexta semana. Escala en unidades Hounsfield (85-644 HU).

Como se puede apreciar en la Figura 111, el quitosano Q1 de elevado Mw muestra una escasa formación de tejido óseo durante todo el ensayo. Este hecho corrobora los resultados obtenidos en la liberación del factor *in vitro*, donde dicho quitosano Q1 mostró una liberación muy rápida del factor al medio. En los ensayos *in vivo*, apenas se aprecia la formación de tejido *de novo*, ya que la proteína no reside el tiempo suficiente para diferenciar las células mesenquimales, que llegan al defecto muscular, hacia linaje osteoblástico y por tanto no genera tejido óseo en la zona del implante.

El quitosano Q9 muestra un perfil intermedio de liberación de la proteína *in vivo* mostrando una liberación más controlada en el tiempo, empezando a las 2 semanas y mostrando niveles estables hasta el final del ensayo.

En cambio el quitosano Q5 a pesar de producir mayor cantidad de tejido óseo ectópico, dicho tejido aparece de forma repentina y elevada a la tercera semana, y además también muestra un claro descenso de los niveles tisulares óseos a partir de la quinta semana, pudiendo estar relacionado dicho efecto con la liberación total de la proteína y la consiguiente escasez de aporte del factor en la zona del implante.

6.3. ESTUDIO DE LA BIODISTRIBUCIÓN DE LA PROTEINA rhBMP-2 *IN VIVO*

Uno de los aspectos más importantes cuando se implanta *in vivo* cualquier construcción de TE portadora de algún tipo de agente bioactivo es la biodistribución del mismo por el organismo una vez se libera al medio circundante, así como las vías de eliminación del compuesto original y de sus productos de degradación.

El conseguir esa información supone disponer de un medio de detección selectivo del compuesto que, al mismo tiempo, presente una alta sensibilidad pues las cantidades presentes inicialmente del agente bioactivo suelen ser pequeñas, disminuyendo aún más a medida que se distribuye por el organismo. Pocos compuestos poseen propiedades fisicoquímicas que cumplan ambos requisitos *per se* (alta sensibilidad y especificidad), por lo que una metodología muy frecuente en farmacia para obtener las características requeridas en la determinación del compuesto objeto de estudio consiste en su marcaje mediante compuestos fluorescentes o isótopos radioactivos.

Realmente lo que se consigue determinar de una forma no invasiva con estas técnicas de marcaje es solamente la cantidad excretada por el sujeto experimental del isótopo radioactivo incorporado en la molécula, lo que en principio da información sobre la vía de metabolización seguida por el mismo al poder determinar de forma independiente la excreción en orina o en heces.

La biodistribución real dentro del organismo requiere, sin embargo, el sacrificio del animal empleado y su seccionamiento para determinar la cantidad de compuesto marcado presente en las diferentes localizaciones anatómicas del mismo. Para ello se realizan autorradiografías de cuerpo entero, realizadas sobre las diferentes secciones obtenidas. Por tanto con esta técnica se puede realizar, no sólo un seguimiento temporal determinando los porcentajes y vías de eliminación del agente marcador, sino también la localización anatómica del agente mediante el sacrificio del sujeto experimental.

Dado que el manejo de isótopos radioactivos requiere la utilización de instalaciones adecuadas para este fin, y los permisos legales necesarios, los estudios incluidos en este apartado se han realizado en colaboración con el Dr. Miguel Angel Morcillo y Dra. Marta Oteo Vives del CIEMAT, cuya ayuda y orientación en la realización de los mismos ha sido inestimable.

La solución madre de polímero con la proteína marcada con ^{125}I utilizada para la formación de los filmes fue analizada mediante un contador de centelleo sólido previa formación de los filmes. De esta manera se determinó con exactitud el marcaje inicial de la muestra a la recepción de la misma.

Se prepararon los filmes de Q9 (1,0%) cargados con 50 µg de rhBMP-2 no marcada y 100 µl de la proteína marcada con ¹²⁵I. La radioactividad total resultante en cada filme tras el proceso de neutralización y lavados fue de $1,7 \pm 0,21$ µCi, teniendo en cuenta el periodo de semidesintegración del marcador al día del ensayo realizado.

En la neutralización de los filmes y posteriores lavados con PBS, se tomaron muestras para determinar la presencia o pérdida de ¹²⁵I libre y/o proteína marcada y así evaluar el marcaje inicial de los filmes previa implantación en el sujeto experimental.

De los 2,26 µCi iniciales cargados en cada filme, al final se detectó un marcaje inicial de $63 \pm 5,0\%$ respecto al marcaje inicial. La mayor pérdida se observó en las soluciones de neutralización, que tras pasar mayor tiempo de contacto con los filmes cargados, mostraron una señal de $33 \pm 3,0\%$ y en los lavados de PBS se encontraron niveles de $1,0 \pm 0,7\%$.

El método operativo por el cual se llevó acabo la implantación de dichos filmes con proteína marcada se realizó siguiendo el mismo procedimiento que en anteriores cirugías, mediante la inserción en saco intramuscular de un filme sin bastidor a un solo lado de la columna, ya que en este caso sólo se implantó un filme por animal experimental.

Tras la cirugía se mantuvieron en jaulas metabólicas independientes que permiten la obtención de las muestras de heces y orines hasta el final del ensayo. Durante el desarrollo experimental se recogieron cada 6-8 horas muestras de orina y heces que, hasta el sacrificio del animal, se realizó a 1, 3, 7 y 10 días.

Todas las muestras recogidas, tanto orines como heces, fueron analizadas empleando un contador de centelleo sólido para cuantificar la presencia de proteína marcada con ¹²⁵I en las mismas. La Figura 112 muestra los resultados obtenidos de la dosis acumulada en porcentaje a los diferentes tiempos.

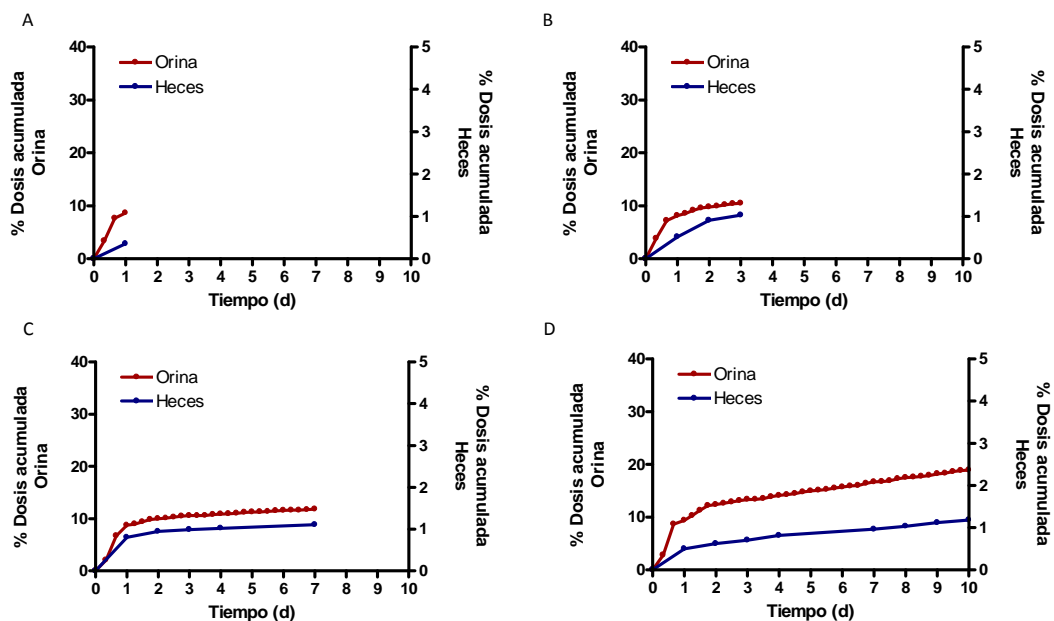


Figura 112. Dosis acumulada de las muestras recogidas de orina y heces de cada animal experimental. Cada gráfica se corresponde a un tiempo determinado de sacrificio del animal, 1, 3, 7 y 10 días con las letras A, B, C y D respectivamente.

En las gráficas se representa el porcentaje de dosis inicial acumulado de la proteína marcada tanto en heces como en orina. Como se puede observar todos los animales mostraron un perfil de excreción similar, siendo la dosis acumulada excretada en orina a las 24 horas aproximadamente igual para todos los sujetos experimentales. La dosis acumulada presentó un valor de alrededor de un 10% de la dosis inicial presente en el filme. Después se observa una tendencia a estabilizarse en todos los casos, excretando de forma constante entre un 0,36 y un 0,82% de la dosis inicial por día. Dicha dosis representa para todas las ratas sacrificadas a tiempos superiores a 24 horas, un valor del 80% de la dosis de proteína marcada total eliminada en la orina.

Un comportamiento similar, pero no tan acentuado, presenta la excreción detectada en las heces, encontrándose valores de dosis acumulada de 0,8-1,0% del total inicial tras las 24 horas de la cirugía.

Esta liberación inicial tan llamativa a las 24 horas por ambas vías, heces y orinas, coincide con una liberación repentina (efecto “burst”) ampliamente descrito en sistemas de liberación de fármacos (Luginbuehl *et al.*, 2004; Kempen *et al.*, 2008). Conocer con exactitud que hay exactamente en las muestras de heces y orines es una tarea complicada, ya que el radioisótopo puede proceder de diferentes fuentes. En primer lugar, existe una cantidad de ^{125}I

libre el cual no se encuentra unido al factor y se libera de forma rápida (menor de un 5% descrito por la casa comercial).

En segundo lugar, el proceso de hinchamiento del filme conlleva la liberación de gran cantidad de proteína, hecho corroborado y observado en las primeras 24 horas en los estudios de liberación *in vitro* realizados con proteína no marcada. En este caso, podría excretarse a orina rhBMP2 marcada ya que presenta un tamaño bastante pequeño (26KDa) capaz de atravesar la membrana del glomérulo renal. En cambio en las heces no es esperable la presencia de proteína marcada ya que sólo el yodo libre es capaz de atravesar la pared intestinal por el transportador de sodio.

Estos resultados concuerdan con el modelo biocinético descrito para el ^{125}I donde se estima que un 90% aproximadamente de la dosis se excreta por vía renal (orina) y menos de un 10% por heces (Leggett, 2010). A través de la relación 9/1 en orina/heces, descrita para la eliminación natural de yodo libre en organismo, podemos suponer que en nuestras muestras recogidas durante los diez días de ensayo sólo se encuentra yodo libre ya que se cumple una relación similar.

Por otra parte en las muestras recogidas podrían existir fragmentos de proteína ^{125}I procedentes de una degradación parcial o total de la proteína, debido a la acción de enzimas. Esta se puede deber bien la acción de enzimas lisosómicas (tal y como describen Frolik y colaboradores con las TFG- β homólogas de esta proteína) como por acción de proteasas extracelulares en el caso de que la proteína se haya inactivado durante el marcado (Frolik *et al.*, 1984). Si existiesen fragmentos de proteína unidos al radioisótopo la relación de la eliminación del marcador no sería 9/1 sino mayor, siendo más en orina que en heces.

Todos estos factores conjuntos contribuyen a esa importante excreción inicial por vía urinaria y, en mucha menor medida, por vía fecal de yodo libre.

Posteriormente, la dosis acumulada aumenta sólo ligeramente con el tiempo en todos los sujetos experimentales, eliminándose por ambas vías en el mejor de los casos un 7-8% adicional al cabo de 10 días, y manteniéndose prácticamente constante (o como mucho un ligero aumento con el tiempo) hasta el final del ensayo (Figura 112-D).

Una observación más clara se obtiene al representar la velocidad de excreción en función del tiempo de ambas vías de eliminación. Los resultados reflejados en la Figura 113 muestran un máximo de la velocidad de excreción del ^{125}I a las pocas horas de la operación (24 horas) y ésta disminuye rápidamente hasta valores prácticamente constantes a los dos días del ensayo.

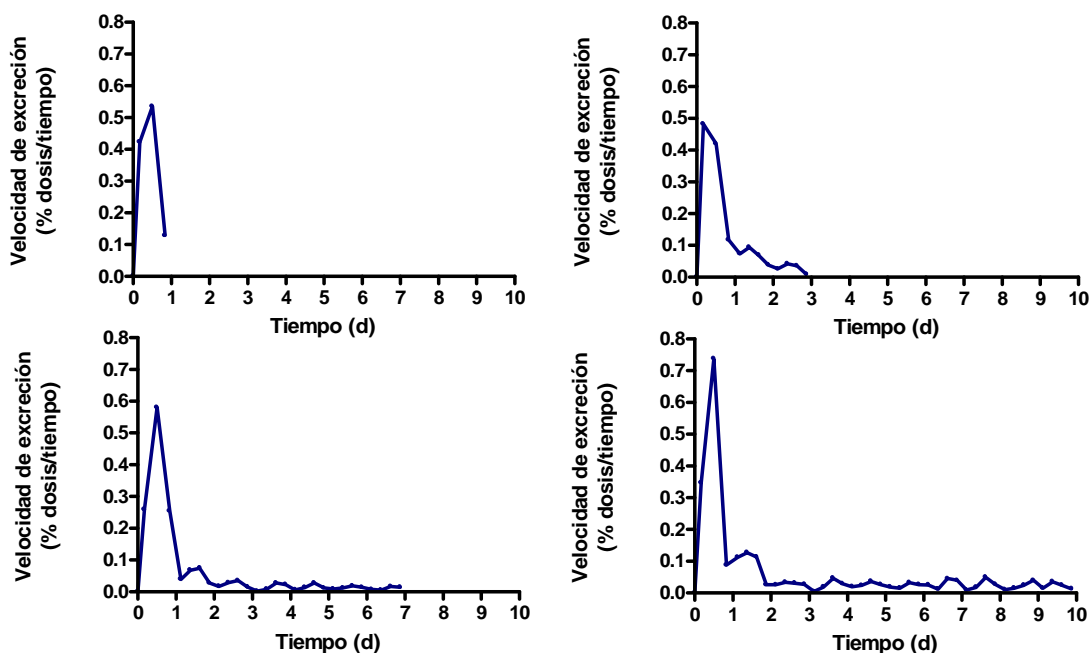


Figura 113. Velocidad de excreción del ^{125}I en función del tiempo de cada rata ($n=1$). A las 24 horas se observa un pico de excreción en todos los animales que disminuye en los días consecutivos, indicando la escasa presencia de ^{125}I por orina y heces.

De los resultados obtenidos se puede deducir que la principal vía de eliminación del ^{125}I es mediante orina, alcanzándose los mayores niveles de excreción tras 24 horas post-cirugía, y a partir de ahí la velocidad de eliminación del compuesto marcado permanece de forma constante en el tiempo.

Aparte de la determinación de la velocidad de excreción del factor marcado tanto en heces como orinas, esta técnica presenta como gran ventaja la posibilidad de evaluar la biodistribución de la proteína en el organismo, localizándose fácilmente las zonas anatómicas donde se acumula ^{125}I y compuestos unidos a él. Para ello se procedió a la realización de una Macroautorradiografía (MARG) de cuerpo entero que permite realizar un análisis y seguimiento de un fármaco o compuesto marcado de forma radiactiva, en el interior de un organismo vivo. De esta forma se puede identificar la localización específica de un fármaco, los sitios de retención e incluso las vías de eliminación del mismo (Gunther *et al.*, 2000).

Tras el sacrificio del animal se procedió a su congelación en una mezcla de hexano y nieve carbónica para su posterior embebimiento en una resina de carboximetilcelulosa, obteniéndose así un bloque del animal entero. Se realizaron los cortes empleando un macrotomo a -30°C , se liofilizaron y se dejaron en contacto durante 1 a 3 semanas (tiempo de exposición) con una placa sensible a la radiación emitida por el ^{125}I .

Mediante el uso del programa del equipo Molecular ImagerTM FX se analizaron los datos recogidos, cuya superposición sobre la imagen anatómica de los cortes histológicos obtenidos del animal completo, permitió obtener información relevante de la biodistribución, tanto del compuesto marcado como de sus productos de degradación (unidos al marcador).

A continuación se presentan las imágenes de los cortes deshidratados y su imagen digital correspondiente con las zonas de acumulación del grupo ¹²⁵I. La intensidad de la señal, guarda relación con la concentración de marcador acumulado en el tejido.

En la Figura 114 se aprecian las zonas anatómicas donde se ha retenido el marcador, presentando un marcaje (en escala de grises) con mayor intensidad en el tiroides (donde sólo se une el yodo libre) y la zona correspondiente al intestino grueso (heces), por donde en su mayoría también se libera yodo libre.

En cambio con menor intensidad se distinguen señales en la zona del implante del filme marcado, correspondientes a la presencia de la proteína marcada retenida por él mismo. Por último se observa señal en la zona de la vejiga, correspondiente a la orina portadora del ¹²⁵I, siendo ésta la otra vía, junto con las heces, de excreción del ¹²⁵I.

La elevada pérdida de marcaje en el primer día, nos hace sospechar que muy probablemente provenga del ¹²⁵I libre inicialmente o liberado por acción proteolítica sobre la proteína marcada, quedando la mayor parte de ella retenida en el filme, tal y como se ha descrito en la biocinética del radioisótopo.

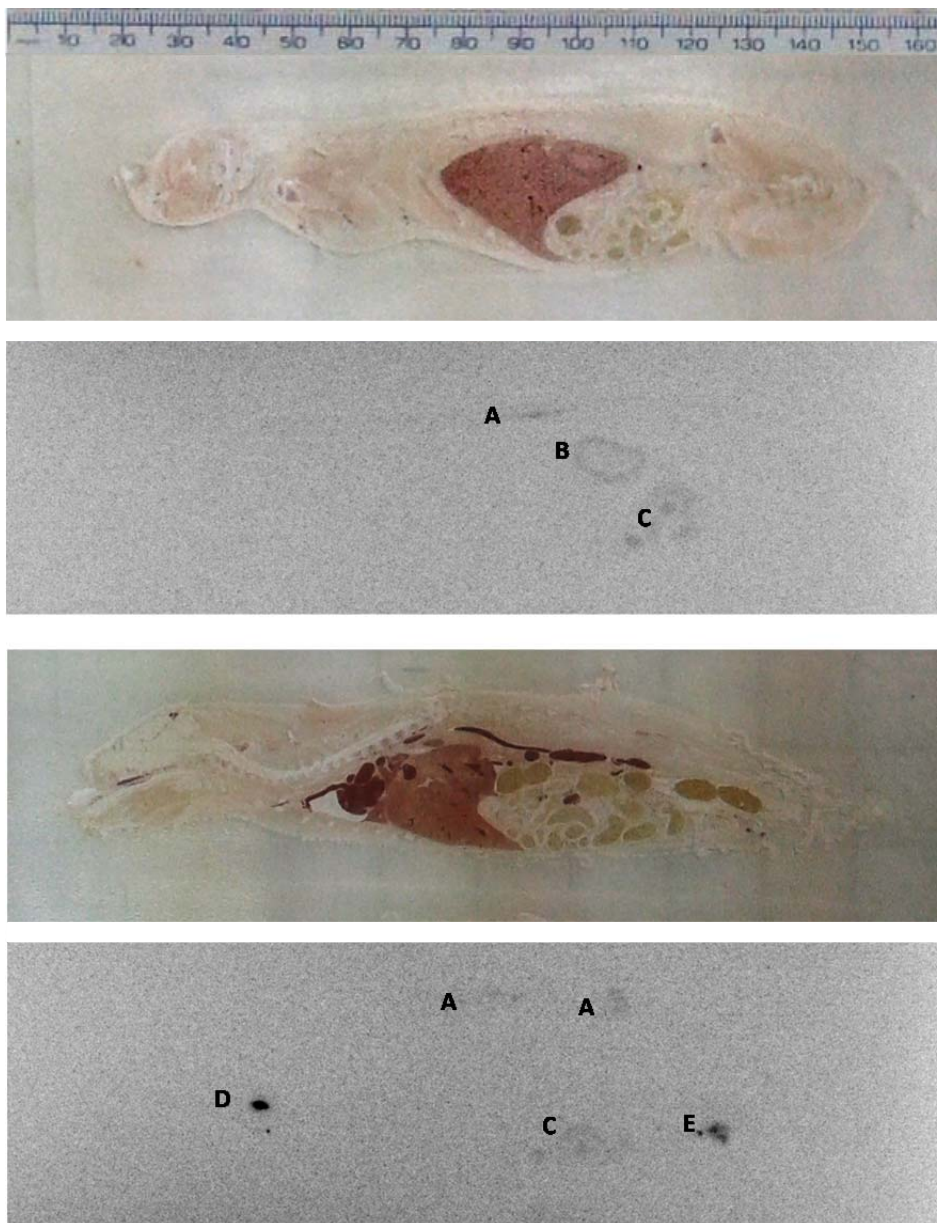


Figura 114. Imágenes del corte liofilizado de cuerpo entero del animal sacrificado a las 24 horas post-operación y abajo su imagen digital correspondiente de dos cortes diferentes. Se han reconocido las zonas anatómicas donde se ha acumulado el radioisótopo siendo: A) Zona del implante (filme), B) Riñón, C) Intestino (Heces), D) Tiroides y E) Vejiga (Orina).

Debido a la baja señal obtenida (hay que tener en cuenta la pequeña cantidad inicial de proteína marcada) se decidió aumentar el tiempo de exposición de los cortes en las placas de fósforo, para obtener una mejor visualización.

Las muestras recogidas a 3 y 7 días presentaron menor número de cortes con señal y solo en determinadas zonas, como el tiroides o el filme. De hecho al cabo de 10 días sólo se detectó marcaje en la zona del implante es decir en el filme (Figura 115).

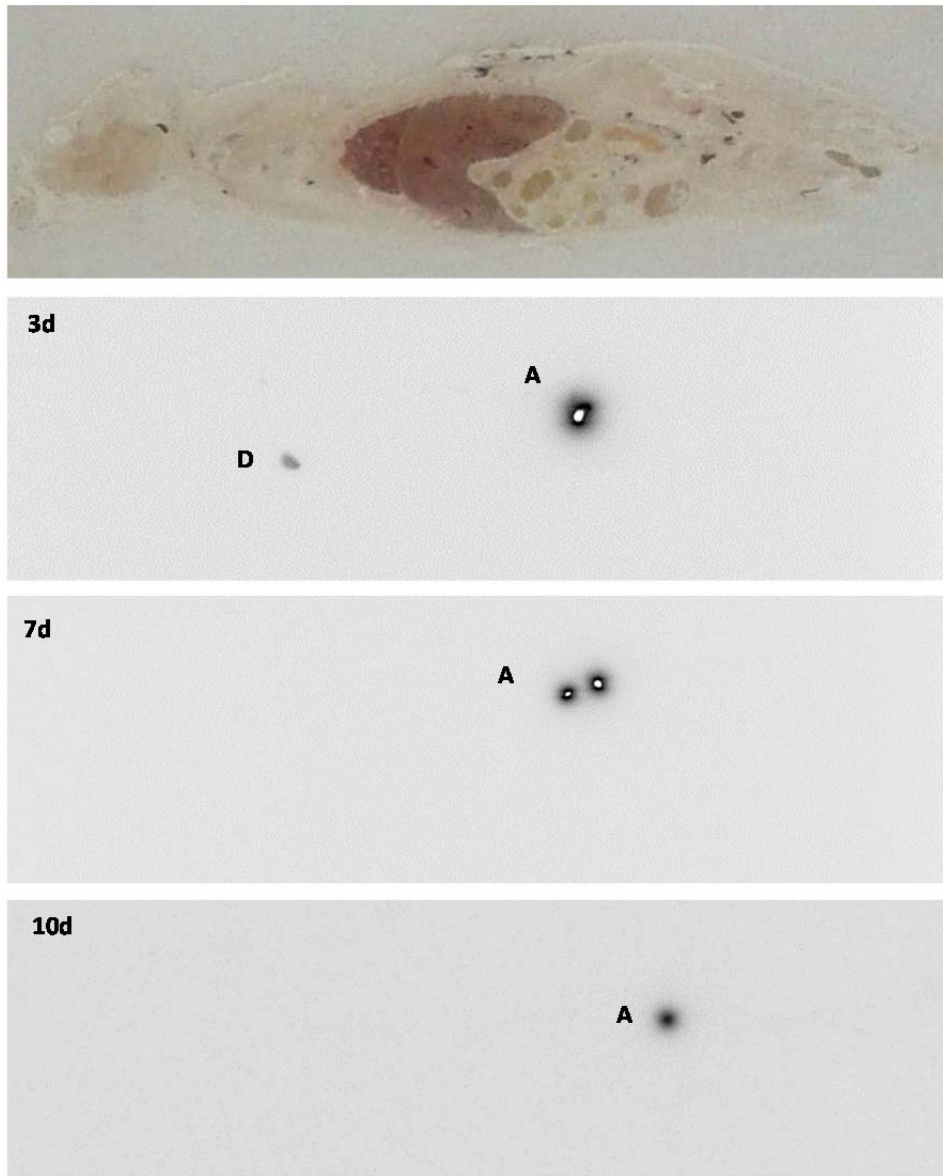


Figura 115. Imágenes de un corte liofilizado representativo y las imágenes digitales obtenidas a los 3, 7 y 10 días de ensayo. Las zonas donde se acumula el ^{125}I son fundamentalmente tiroides y zona del implante, es decir el filme. Se puede observar la presencia y por lo tanto permanencia de la proteína en el filme tras el tiempo de ensayo.

Los hechos anteriores indican que la proteína rhBMP2 unida al ^{125}I permanece retenida en el filme de quitosano durante diez días consecutivos. A partir de las primeras 24 horas la proteína no migra a otros órganos vitales, y se muestra su retención en el filme hasta el final del ensayo.

Las experiencias *in vivo* realizadas en este apartado final de la tesis, a pesar de su carácter preliminar debido al bajo número de sujetos experimentales en las mismas, nos

permite matizar parte de los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* previamente expuestos.

Los estudios *in vitro* proporcionan una velocidad de degradación mucho más rápida a la observada *in vivo*, tal vez debido a la menor duración del pH ácido inicial, promotora de este proceso. *In vivo* sólo al cabo de 6 semanas se observa la integración del filme con el tejido circundante para algunos de los quitosanos empleados en el estudio.

Cuando se comparan los diferentes quitosanos a un punto temporal, se observa que los de alto Mw no se degradan a las 6 semanas, permaneciendo prácticamente intacto el filme en el tiempo de ensayo. El resto de quitosanos, de Mw bajo e intermedio, se han integrado en ese tiempo con el tejido circundante.

La degradación del transportador con proteína rhBMP-2 tiene lugar en tiempos notablemente inferiores a los detectados en ausencia del factor, observándose además una clara formación de tejido óseo, según revela las imágenes de TCM, a los 21 días post-cirugía. La creación de hueso ectópico está directamente relacionada con la dosis de proteína.

Por micro tomografía computarizada, se pudo evaluar no solo la formación de hueso ectópico en función del tiempo, sino además el efecto notable que conlleva la concentración inicial de proteína en los filmes, aumentado la intensidad y el volumen de la señal con la cantidad de proteína incorporada.

Los estudios de biodistribución realizados con proteína marcada indican que ésta queda retenida en el filme al cabo de 10 días. Se ha observado un efecto “burst” en las primeras 24h detectado por la presencia de marcador tanto en orina como en heces. Las principales vías de excreción de los productos de degradación de esta proteína son la vía fecal y urinaria. Se observó una notable acumulación de ¹²⁵I libre en el tiroides en las primeras 24h que fue disminuyendo siendo inapreciable al final del ensayo.

V. CONCLUSIONES

Todos los quitosanos empleados en esta Memoria se caracterizaron siguiendo las normas ASTM determinándose los parámetros fisicoquímicos más relevantes y relacionándolos con los límites establecidos por las casas comerciales. Se clasificaron los quitosanos en función de su Mw y DD (parámetros influyentes en sus aplicaciones bilógicas) en tres grandes grupos (alto, medio y bajo Mw).

1. A partir de los quitosanos se obtuvieron filmes homogéneos, reproducibles y transparentes. Todos ellos presentaron un carácter hidrofílico permitiendo ser consideradas como superficies aptas para los cultivos celulares. Tanto la rugosidad de la superficie como el espesor de los mismos dependen de la concentración de la solución de quitosano empleada, obteniéndose una relación lineal global entre estos parámetros para todos los quitosanos.

2. Los quitosanos de Mw alto presentaron la misma velocidad de degradación en medio ácido (pH 5,4) mientras que los de Mw intermedio y bajo mostraron perfiles de degradación propios de cada quitosano, destacando el Q12 (con elevado DD) como el quitosano con la cinética de redisolución del filme más rápida. Los filmes de quitosanos de Mw bajo e intermedio alcanzaron niveles de redisolución finales superiores, llegando a la total de redisolución en 8-9 días mientras que los de Mw alto no alcanzaron la redisolución total a tiempo final del ensayo.

3. La degradación ácida y enzimática simultánea (pH 5,4 y lisozima) muestra una velocidad de disolución superior en todos los casos a la simplemente ácida. Es posible agrupar, en éste caso, a los quitosanos de Mw intermedio y bajo en un solo perfil, destacando de nuevo como diferente el comportamiento del Q12. Los estudios indican la existencia de otros parámetros no identificados que influyen de forma activa en la degradación.

4. Todos los filmes permitieron la adhesión y proliferación de la línea celular C2C12. La comparación del comportamiento de proliferación con respecto al control de plástico indica en todos ellos un claro retraso en el crecimiento celular de aproximadamente un día. No obstante al final del período de estudio se obtienen valores similares (80%) a los obtenidos en el control de plástico.

5. El Mw y el DD mostraron ser parámetros de gran relevancia en los ensayos celulares, destacando los filmes de quitosanos de menor Mw (Q4, Q5, Q9, Q11 y Q12) y mayor DD (80-90%) como las superficies óptimas para los mismos. La concentración de polímero empleada

en los filmes mostró un efecto inversamente proporcional a la proliferación celular, siendo las menores concentraciones (0,1 y 0,25%) las concentraciones más favorables para dicho proceso.

6. El retraso observado en el crecimiento celular se detectó en el proceso de adhesión, siendo la densidad celular similar al control en las etapas iniciales de la misma. Dicho retraso se mostró en las etapas intermedias (aplanamiento y extensión firme) del proceso de adhesión. Este hecho está corroborado por el mantenimiento de la morfología celular redondeada inicial durante tiempos más prolongados en el caso de los filmes de quitosano.

7. Los parámetros Mw y DD no presentaron diferencias significativas en el proceso de adhesión celular, siendo similar entre todos los filmes y con respecto al control de plástico. No obstante sí se observó una influencia significativa de la concentración de polímero, siendo más favorable para el proceso de adhesión mayores concentraciones (que cursan asimismo con valores mayores de rugosidad), afectando este hecho positivamente en las interacciones iniciales con el sustrato.

8. Los filmes portadores de rhBMP-2 permitieron liberar la proteína de forma activa, como indica la diferenciación celular detectada mediante la cuantificación de la actividad ALP. Los filmes activados presentaron procesos de adhesión y proliferación más estables y similares a los del control, siendo este efecto llamativo en aquellos quitosanos con características iniciales menos favorables para estos procesos celulares.

9. La proteína se mantuvo en su forma activa tras 7 días de ensayo a 37°C. La cantidad de proteína liberada cuantificada en DMEM completo presentó en todos los casos una liberación inicial elevada (efecto "burst") fuertemente dependiente de la dosis de proteína cargada en el filme. La cinética de liberación se ajustó a un proceso exponencial de una sola constante de tiempo, excepto para la menor carga de proteína empleada (5 µg), en la que los datos fueron compatibles con un proceso lineal. La dependencia del $t_{1/2}$ con la carga inicial (para aquellos casos donde se realizó el ajuste exponencial) indica que es compatible con una cinética de segundo orden.

10. La liberación de proteína de filmes de diferentes concentraciones con carga inicial constante de proteína se ajustó a una liberación exponencial de una sola constante de tiempo.

La representación del $t_{1/2}$ en función de la concentración efectiva de proteína para cada uno de filmes indica que el proceso de liberación es compatible con una cinética de segundo orden.

11. La liberación de la proteína empleando quitosanos de distinta naturaleza se ajustó asimismo a una exponencial de una constante de tiempo, excepto en el caso de quitosanos de Mw alto (Q1) donde la liberación es extremadamente rápida.

12. Los filmes de diferentes quitosanos mostraron una integración en el tejido diferente en función del Mw y del DD, no presentándose reacciones adversas al mismo en ningún caso. Los quitosanos de menor Mw se caracterizan por unos mayores niveles de degradación, estando matizados estos resultados por el efecto del DD.

13. Los ensayos *in vivo* de la degradación del transportador en función de la concentración (Q11) mostraron en todos los casos su integración a los 42 días (6 semanas) post-cirugía. La degradación *in vivo* presentó una cinética más lenta que la observada en condiciones *in vitro*.

14. La degradación del transportador con proteína rhBMP-2 tiene lugar en tiempos notablemente inferiores a los existentes en ausencia del factor, observándose además una clara formación de tejido óseo, según revela las imágenes de histología (TCM) a los 21 días post-cirugía. La creación de hueso ectópico está directamente relacionada con la dosis de proteína presente en el filme. Este hecho se corroboró asimismo mediante estudios en función del tiempo por micro tomografía computarizada.

15. Los estudios de biodistribución realizados con proteína marcada indican que ésta queda retenida en el filme al cabo de 10 días. Se ha observado el efecto “burst” del grupo ^{125}I en las primeras 24h, detectándose la presencia de este marcador tanto en orina como en heces. Se observó asimismo una notable acumulación de ^{125}I libre en el tiroides disminuyendo ésta señal con el tiempo y siendo inapreciable al final del ensayo, mientras que aún se aprecia señal de la proteína marcada en la zona de implantación, es decir en el filme inicial.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Abarategi, A., Civantos, A., Ramos, V., Sanz Casado, J.V., López-Lacomba, J.L. (2008b). Chitosan film as rhBMP2 carrier: Delivery properties for bone tissue application. *Biomacromolecules*, 9: 711-718.

Abarategi, A., Lópiz-Morales, Y., Ramos, V., Civantos, A., López-Durán, L., Marco, F., López-Lacomba, J.L. (2010). Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. *Journal of Biomedical Material Research A*, 95 (4): 1132-41.

Abarategi, A., Moreno-Vicente, C., Ramos, V., Aranaz, I., Casado, J.V., Lopez-Lacomba, J.L. (2008a). Improvement of Porous beta-TCP Scaffolds with rhBMP-2 Chitosan Carrier Film for Bone Tissue Application. *Tissue Engineering Part A*, 14 (8): 1305-1319.

Abarategi, A., Moreno-Vicente, C., Ramos, V., Pérez-Rial, S., Garcia-Cantalejo, J., Sisniega, A., Civantos, A., Vaquero, J.J., Sanz-Casado, J.V., Lopez-Lacomba, J.L. (2009). Gene expression profile on chitosan/rhBMP-2 films: A novel osteoinductive coating for implantable materials. *Acta Biomaterialia*, 5: 2633–2646.

Abd-Elmohdy, F.A., El-Sayed, Z., Essam, S., Hebeish, A. (2010). Controlling chitosan molecular weight via bio-chitosan analysis. *Carbohydrate Polymers*, 3 (82): 539-542.

Abdou, E. S., Nagy, K. S. A., Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99: 1359-1367.

Abrahams, J.M., Chen, W., Zahos, P. (2009). Biopolymer System for tissues sealing WO2009017753.

Agrawal, P., Strijkers, G.S., Nicolay, K. (2010). Chitosan-based systems for molecular imaging. *Advanced Drug Delivery Resviews*, 62: 42-58.

Agulló, E., Mato, R., Peniche, C., Tapia, C., Heras, A., San Román, J., Arquelles, W. (2004) Quitina y quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo Editorial De La Pontificia Universidad Católica Del Perú, Lima, Perú.

Aiba, S. (1991). Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13 (1): 40-44.

Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14 (4): 225-228.

Aiba, S. (1993). Studies on chitosan: 6. Relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15 (4): 241-245.

Amaral, I.F., Cordeiro, A.L., Sampaio, P., Barbosa, M.A. (2007). Attachment, spreading and short-term proliferation of human osteoblastic cells cultured on chitosan films with different degrees of acetylation. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 4 (18): 469-48.

Anthonsen, M., Varum, K.M. y Smidsrød, O. (1993). Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 22 (3): 193-201.

Arai, K., Kinumaki, T., Fujitta, T. (1968). Toxicity of chitosan. *Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*, 56: 89-94.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3: 203-230.

ASTM F2103-01. (2007) Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue-engineered medical product applications.

Atala, A. (2004). Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Research*, 7: 15-31.

Azad, A.K., Sermsintham, N., Chandkrachang, S., Stevens, W.F. (2004). Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 69 (2): 216-222.

Baron, R.E. (2003). Anatomy and biology of bone matrix and cellular elements. Chapter 1. General principles of Bone Biology. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 5° Ed.* Favus M.J, Ed. American Society for Bone and Mineral Research, Washington DC, 1-8.

Baskar, D., Sampath-Kumar, T.S. (2009). Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 78: 767-772.

Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1 (57): 35-52.

Bethesda, MD (2009). Stem Cell Markers. En *Stem Cell Information* [World Wide Web site]. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendix.aspx>.

Bhattarai, N., Gunn, J., Zhang, M. (2010). Chitosan based hydrogels for controlled localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1 (62): 83-89.

Bhuvaneshwari, S., Sruthi, D., Sivasubramanian, V., kalyani, N. y Sugunabai, J. (2007) Development and characterization of chitosan film. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 1 (2): 292-299.

Bielby, R., Jones, E., McGonagle, D. (2007). The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury International Journal of the Care of the Injured*, 1 (38): 26-32.

Bokura, H.; Kobayashi, S. (2003). Chitosan decreases total cholesterol in women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *European journal of clinical nutrition*, 57: 721-5.

Bose, S., Roy, M., Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 10 (30): 548-54.

Boskey, A.L. (2006). Mineralization, Structure and Function of Bone. *Bone and Cartilage Metabolism*, 1st Ed. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (eds), Academic Press, San Diego, 345-360.

Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 23: 337-342.

Bozal, C.B. Biología del osteocito. (2006) *Actualizaciones en Osteología*, 2: 19-21.

Braddock, M., Houston, P., Campbell, C., Ashcroft, P. (2001). Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News in Physiological Sciences*, 16: 208-213.

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

Bragdon B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: A critical review. *Cellular signaling*, 23: 609-620.

Brouwer, J., Leeuwen-Herberts, T., Otting- Ruit, M. (1984). Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay. *Clinical Chimia Acta*, 142: 21-30.

Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Roberts, G., Rinaudo, M. (2001b). Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography, (2001b) *Polymer*, 42 (25): 09921-09927.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J., Rinaudo, M. (2001a). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42 (8): 3569-3580.

Bumgardner, J.D., Wiser, R., Gerad, P.D., Bergin, P., Chestnutt, B., Marini, M., Ramsey, V., Elder, S., Gilbert, J. (2003b). Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopedic and craniofacial/dental implants *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 14 (5): 423-438.

Bumgardner, J. D., R. Wiser, S. H. Helder, R. Jouett, Y. Yang, and J. L. Long. (2003a). Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 14: 1401-1409.

Bumgardner, J.D., Chesnutt, B.M., Yuan, Y., Yang, Y., Appleford, M., Oh, S., McLaughlin, R., Elder, S.H., Ong, J.L. (2007). The integration of chitosan-coated titanium in bone: An *in vivo* study in rabbits. *Implant Dentistry*, 16 (1): 66.

Busilacchi, A., Gigante, A., Mattioli-Belmonte, M., Manzotti, S., Muzzarelli, R.A.A. (2013). Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 98: 665-676.

Cabrera, J.C. P., Cutsem, P. (2005). Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochemical Engineering Journal*, 25 (2): 165-172.

Cao, X., Chen, D. (2005). The BMP signaling and *in vivo* bone formation. *Gene*, 357: 1-8.

Caplan, A. I. (2000). Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Engineering*, 6: 1-8.

Cohen, I.M, Furnari, J.C. (2012). The modern trends in radiochemistry and their applications. *Revista Química Viva*, 2: 73-90.

Chatelet, C., Damour, O., Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22 (3): 261-268.

Chellat, F., Tabrizian, M., Dumitriu, S., Chorne, E., Rivard, C.H., Yahia, L.J. (2000). Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 53 (5): 592-599.

Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22: 233-241

Chiang, C.L., Chang, C.T., Sung, H.Y. (2003). Purification and properties of chitosanase from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (2): 260- 267.

Choi, C.Y., Kim, S.B., Pak, P., Ki, Y., Dong, I. Chung, Y.S. (2007). Effect of N-acylation on structure and properties of chitosan fibers. *Carbohydrate Polymers*, 68: 122-127.

Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y.Y., Hamblin, M.R. (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-Infect Therapy*, 9 (7): 857-879.

Dennhart, N., Fukamizo, T., Brzezinski, R., Lacombe-Harvey, M., Letzel, T. (2008). Oligosaccharide hydrolysis by chitosanase enzymes monitored by real-time electrospray ionization–mass spectrometry. *Journal of Biotechnology*, 134 (3-4): 253-260.

Desbrieres, J. (2002). Viscosity of Semiflexible Chitosan Solutions: Influence of Concentration, Temperature, and Role of Intermolecular Interactions. *Biomacromolecules*, 3 (2): 342-349.

Dhanikula, A., Panchangnula, R. (2004). Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 6 (3): 88-99.

Domard, A. (2011). A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrates Polymers*, 84 (2): 696-703.

Domard, A., Domard, M. (2002). Chitosan: structure–properties relationship and biomedical applications. In: Dumitriu S, editor. *Polymeric biomaterials*, New York: Marcel Dekker, 187-212.

Dunstan, C.R., Pivonka, P. (2012). Role of mathematical modeling in bone fracture healing. *International Bone & Mineral Society .Bonekey*, 1 (221).

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

Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V.S. (2004). Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of scientific and industrial research*, 63: 20-31.

Epstein, N. E. (2011). Pros, cons and cost of infuse in spinal surgery. *Surgical Neurology International*, 2:10.

Fakhry, A., Schneider, G.B., Zaharias, R., Senel, S. (2004). Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials*, 25 (11): 2075-2079.

Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 4ªEd. 2002, 1774-5 Monografía del hidrocloreto de quitosano.

Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 2011. Monografía del quitosano.

Forriol, F., Esparza R. (2008). Tissue engineering: Application of pluripotent stem cells in traumatology and orthopedic surgery. *Trauma Fundación MAPFRE*, 19 (2): 88-101.

Freier, T., Koh, H. S., Kazazian, K., Shoichet, M. S. (2005). Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials*, 26: 5872-5878.

Frolik, C.A., Wakefield, L.M., Smith, D.M., Sporn, M.B. (1984). Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor beta in normal rat kidney fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 259 (17): 10995-11000.

Frost, H. (1991). A new direction for osteoporosis research: a review and proposal. *Bone*, 12: 429-437.

Fukamizo, T., Honda, Y., Goto, S., Boucher, I., Brzezinski, R. (1995). Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. *Journal of Biochemistry*, 311: 377-383.

Galed Ceresuela, Gemma. (2006). Biopolímeros Quitina/Quitosano: Optimización de los procesos de Obtención y Caracterización Funcional Estudios sobre Quitina y Quitosana. Tesis para optar al Grado de Doctor.

Galed, G., Miralles, B., Paños, I., Santiago, A., Heras, A. (2005). N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydrate Polymers*, 62: 316-320.

Galed, G., Miralles, B., Paños, I., Santiago, A., Heras, A. (2005). N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydrate Polymers*, 62 (4): 316-320.

Gartner, L.P., Hiatt, J.L. (2002). Capítulo 7: Cartílago y hueso. Texto Atlas de histología 2ª edición. *Mc Graw Hill Interamericana*, 127-151.

González Muñoz, Diana. (2004). Plegamiento *in vitro* de la rhBMP-2. Caracterización inicial del dímero activo mediante fluorescencia. Tesis para optar al grado de doctor en farmacia.

González Prada, J.M. web www.alimmenta.com.

Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Peniche, C., Higuera-Ciapara, I. (2000). Chitin and chitosan, volume 41: 265-308.

Goycoolea, F.M., Remuñán-López, C., Alonso, J.M. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. En: (Vila Jato, J.L. ed.) *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pag. 103-131.

Greene, A.H., Bumgardner, J.D., Yang, Y., Jon Moseley, J., Haggard, W.O. (2008). Chitosan-coated stainless steel screws for fixation in contaminated fractures. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466: 1699-1704.

Gunther, C., Panzer, M., Tauber, U. (2000). Quantitative radioluminography of 125 Iodine whole-body autoradiograms. *Regulatory Toxicology and pharmacology*, 31: 51-56.

Gyawali, D.R. (2009). In situ crosslinkable polyesters for tissue engineering and drug delivery. Tesis para optar al grado de doctor.

Haipeng, G., Yinghui, Z., Jianchun, L., Yandao, G., Nanming, Z., Xiufang, Z. (2000). Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 52 (2): 285-95.

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). Comparison of Alamarblue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro*, 18: 703-710.

Hamilton, V., Yuan, Y., Rigney, D.A., Puckett, A.D., Ong, J. L., Yang, Y., Elder, S.H., Bumgardner, J.D. (2006). Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17: 1373-1381.

Hankiewicz J, Swierczek E. (1974). Lysozyme in human body fluids. *Clinica Chimia Acta*, 57: 205-9.

Harish-Prashanth, K.V., Tharanathan, R.N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18 (3): 117-131.

Harris, R., Lecumberri, L., Mateos-Aparicio, I., Mengibar, M., Heras, A. (2011). Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 84 (2): 803-806.

He, Q., Ao, Q., Gong, Y., Zhang, X. (2011). Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22: 2791-2802.

Hench, L.L., Polak, J.M. (2000). Third-Generation Biomedical Materials. *Science*, 295: 1014-1017.

Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained- action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52 (12): 1145- 1149.

Hill, P.A. (1998). Bone remodeling. *British journal of orthodontics*, 25 (2): 101-107.

Hirai, A., Odani, H., Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin*, 26: 87-94.

Hirano, H., Seino, Y., Akiyama, Y., Nonaka, I. (1990). Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration, in: C.G. Gebelein and R.L. Dunn (Eds.), *Progress in Biomedical Polymers*, Plenum Press, New York, 283-289.

Hirano, S., Tsuchida, H., Nagao, N. (1989). N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymatic hydrolysis. *Biomaterials*, 10: 574-576.

Hixon, A.W., Crowell, J.H. (1931). Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Industrial and Engineering Chemistry*, 23: 923-931.

Hsiao, Y-C., Lin, Y-W., Su, C-K., Chiang, B-H. (2008). High degree polymerized chitooligosaccharides synthesis by chitosanase in the bulk aqueous system and reversed micellar microreactors. *Process Biochemistry*, 43 (1): 76-82.

Huang, R., Du, Y., Yang, J., Fan, L. (2003). Influence of functional groups on the *in vitro* anticoagulant activity of chitosan sulfate. *Carbohydrate Research*, 338: 483-489.

Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 15: 1326-1331.

Imai, Y., Youn, M.Y., Inoue, K., Takada, I., Kouzmenko, A. Kato, S. (2013). Nuclear receptors in bone physiology and diseases *Physiological Reviews*, 93: 481-523.

Izume, M., Nagae, S., Kawagishi, H., Mitsutomi, M., Ohtakara, A. (1992). Action Pattern of Bacillus sp. No. 7-M Chitosanase on Partially N-Acetylated Chitosan. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56: 448-453.

Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh-Kumar P-T., Nair, S.V., Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29: 322-337.

Jridi, M., Hajjig, S., Ben-Ayed, H., Lassoued, I., Mbarek, A., Kammoun, M., Souissi, N., Nasri, M. (2014). Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67: 373–379.

Jumma, M., Furkert, F.H., Muller, B.W. (2002). A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *The European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 3: 115-123.

Kallai, I., Lenthe, G.H., Ruffoni, D., Zilbermana, Y., Müller, R., Pelled, G., Gazit, D. (2010). Quantitative, structural and image-based mechanical analysis of nonunion fracture repaired by genetically engineered mesenchymal stem cells. *Biomechanics*, 43 (12): 2315-2320.

Kasaai, M. R. (2007). Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68: 477-488.

Kasaai, M. R. (2010). Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate Polymers*, 79: 801-810.

Kean, T., Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (1): 3-11.

Kempen, D.H.R., Lu, L., Hefferan, T.E., Creemers, L.B., Maran, A., Classic, K.L., Dhert, W.J.A., Yaszemski, M.J. (2008). Retention of *in vitro* and *in vivo* BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 29: 3245-3252.

KFDA. (1995). Korea Food and Drug Administration. *Additive Code*.

King, W.J., Krebsbach, P.H. (2012). Growth factor delivery: How surface interactions modulate release *in vitro* and *in vivo*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 1239-1256.

Klokkevold, P.R., Vandemark, L., Kenney, E.B., Bernard, G.W. (1996). Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetylglucosaminoglycan) *in vitro*. *Journal of Periodontology*, 67 (11): 1170-1175.

Kofuji, K., Qian, C., Nishimura, M., Sugiyama, I., Murata, Y., Kawashima, S. (2005). Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *European Polymer Journal*, 41: 2784-2791.

Khor E., Lim, L.Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24: 2339-2349.

Kumar, M.M., Muzzarelli, R.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Dom, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 10: 6017-6084.

Kumirska, J., Weinhold, M.X., Thöming, J., Stepnowski, P. (2011). Biomedical activity of chitin/chitosan cased material - Influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. *Polymers*, 3: 1875-1901.

Kurita, K. (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability Biodegradable Polymers and Macromolecules*, 59 (1-3): 117-120.

Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T., Nishiyama, Y. (2000). Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymer*, 42 (1): 19- 21.

Kurita, K., Kamiya, M., Nishimura, S.I. (1991). Solubilization of a rigid polysaccharide: controlled partial N-acetylation of chitosan to develop solubility. *Carbohydrate Polymer*, 1 (16): 83-92.

Kurita, K., Sannan, T., Iwakura, Y. (1977). Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses. *Die Makromolekulare Chemie*, 178 (12): 3197-3202.

Kuroiwa, T., Y. Noguchi, M. Nakajima, S. Sato, S. Mukataka y S. Ichikawa. (2008). Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylose-coated magnetic nanoparticles. *Process Biochemistry*, 43 (1): 62-69.

Lahiji, A., Sohrabi, A., Hungerford, D.S., Frondoza, C.G. (2000). Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *Journal Biomedical Materials Research*, 51 (4): 586-95.

Langer, R. (1980). Polymeric delivery systems for controlled drug release. *Chemical Engineering Communications*, 6: 1-48.

Langer, R., Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 14, 260 (5110): 920-6.

Langer, R.S., Peppas, N.A. (1981). Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, 2 (4): 201-14.

Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J.P. (2000). Principles of tissue engineering. Academic Press;

Larez-Velásques, L.C. (2008). Some potentialities of chitin and chitosan for uses related to agriculture in Latin America. *Revista UDO Agrícola*, 8: 1-22.

Lee, J-Y., Nam, S-H., Im, S-Y., Park, Y-J., Lee, Y-M., Seol, Y-J., Chung, C-P., Lee, S-J. (2002). Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Journal of Controlled Release*, 78: 187-197.

Lee, J. E. (2004). Effects of a chitosan scaffold containing TGF-beta1 encapsulated chitosan microspheres on *in vitro* chondrocyte culture. *Artificial Organs*, 28: 829-839.

Leggett, R.W. (2010). A physiological system model for iodine for use in radiation protection. *Radiation Research*, 174: 496-516.

Lian, J.B., Stein, G.S. (1992). Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation: Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 3 (3): 269-305.

Lieberman, J.R., Daluiski, A., Einhorn, T.A. (2002). The role of growth factors in the repair of bone. *Journal of bone and joint surgery*, 84-A (6): 1032-1044.

Liechty, W.B., Kryscio, D.R., Slaughter, B.V., Peppas, N.A. (2010). Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1: 149-173.

Lieder, R., Darai, M., Thor, M.B., Ng, C.H., Einarsson, J.M., Gudmundsson, S., Helgason, B., Gaware, V.S., Maasson, M., Gislason, J., Orlygsson, G., Sigurjoonsson, O.E. (2012). *In vitro*

bioactivity of different degree of deacetylation chitosan, a potential coating material for titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100 (12): 3392-9.

Lissenberg-Thunnissen, S.N., Gorter, D.J.J., Sier, C.F.M., Schipper, I.B. (2011). Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International Orthopaedics*, 35:1271-1280.

Liu, H., Yin, Y., Yao, K. (2007). Construction of chitosan-gelatin-hyaluronic acid artificial skin *in vitro*. *Journal of Biomaterials Applications*, 21 (4): 413-30.

Liu, J., Zhang, J., Xia, W.. (2008). Hypocholesterolemic effects of different chitosan samples *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, 107 (1): 419-425.

Liu, X., Chu, P.K., Ding, C. (2004). Surface modification of titanium, titanium alloys and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering Reports*, 47: 49-121.

Liu, X., Lie, M., Mao, Z., Gao, C. (2011). Chitosan-based biomaterials for tissue repair and regeneration. *Advances in Polymer Science*, 244: 81-128.

Liu, Y., Wu, G., De Groot, K. (2010). Biomimetic coatings for bone tissue engineering of critical-sized defects. *Journal of the Royal Society Interface*, 5 (6-7): 631-47.

Lo, K.W-H., Ulery, B.D., Ashe, K.M., Laurencin, C.T. (2012). Studies of bone morphogenetic protein based surgical repair. *Advanced Drug delivery review*, 64 (12): 1277-1291.

López-Lacomba, J.L., García-Cantalejo, J.M., Sanz-Casado, J.V., Abarrategi, A., Correas, V., Ramos, V. (2006). Use of rhBMP-2 activated chitosan films to improve osseointegration. *Biomacromolecules*, 7: 792-798.

López-Lacomba, J.L., García-Cantalejo, J.M., Sanz-Casado, J.V., Ramos, V. (2000). Método de producción de filmes de quitosán con una alta capacidad de adherencia celular, producto obtenido y aplicaciones. España, P200002057 PCT/ES01/00322.

Luginbuehl, V., Meiner, L., Merkle, H.P., Gander, B. (2004). Localized delivery of growth factors for bone repair. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58: 197-208.

Malafaya, P.B., Santos, C.T., Giensven, M., Reis, R.L. (2008). Morphology, mechanical characterization and *in vivo* neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures. *Biomaterials*, 29: 3914-3926.

Malafaya, P.B., Silva, G.A., Reis, R.L. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (4-5): 207-233.

Manni, L., Ghorble-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., Nasri, M. (2010). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from "Bacillus cereus" SV 1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162 (2): 345-357.

Mao, J.S., Zhao, L.G., Yin, Y.J., Yao, K.D. (2003). Study of novel chitosan-gelatin artificial skin *in vitro*. *Journal of Biomedical*, 24 (6): 1067-1074.

Martin-Diana, A. B., Rico, D., Barat, J. M., Barry-Ryan, C. (2009). Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 590-600.

Másson, M., Holappa, J., Hjalmsdóttir, M., Rúnarsson, Ö. V., Nevalainen, T., Järvinen, T. (2008). Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 74: 566-571.

Maxson, S., Lopez, E.A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkva, A. (2012). Concise Review: Role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem cells Translational Medicine*, 1: 142-149.

Mehta, M., Schmidt-Bleek, K., Nuda, G.N., Mooney, D. (2012). Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 1257-1276.

Mengatto, L.N., Helbling, I.M., Luna, J.A. (2012). Recent advances in chitosan films for controlled release of drugs. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, 6: 156-170.

Menzies, K.I., Lyndon, J. (2010). The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optometry and Visión Science*, 87 (6): 387-399.

Mizuno, K., Yamamura, K., Yano, K. (2003). Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 64(1):177-181.

Morcillo-Alonso, M.A., Martín-Martín, F. R., Navarro-Bravo T. (2002). Use of radioisotopes in biokinetic models with experimental animals. *Revista Salud Ambiental*, 1 (2): 16-21.

Mori, T., Murakami, M., Okumura, M., Kadosawa, T., Uede, T., Fujinaga, T. (2005). Mechanism of Macrophage Activation by Chitin Derivatives. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67: 51-56.

Murphy-Ulrich, J.E. (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *The journal of clinical investigation*, 107 (7): 785-790.

Muzzarelli, R.A. (1997). Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Molecular Life Science*, 53 (2): 131-140.

Muzzarelli, R.A., Mattioli-Belmonte, M., Tietz, C., Biagini, R., Ferioli, G., Brunelli, M.A. (1994). Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 15: 1075-81.

Muzzarelli, R.A., Muzzarelli, C. (2005). Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. *Advanced Polymer Science*, 186: 151-209.

Muzzarelli, R.A., Greco, F., Busilacchi, A., Sollazzo, V., Gigante, A. (2012). Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydrate Polymer*, 89: 723-739.

Muzzarelli, R.A. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76: 167-82.

Nair, L.S., Laurencin, C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32: 762–798.

Naznin, R. (2005). Extraction of chitin and chitosan from shrimp (*Metapenaeus monoceros*) shell by chemical method. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (7): 1051-1054.

Neammark, A., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Bunaprasert, T., Suchaphol, P. (2007). *In vitro* biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film. *Carbohydrate Polymers*, 68 (1): 166-172.

Nociari, M.M., Shalev, A., Benias, P., Russo, C. (1998). A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 213: 157-167.

Nordtveit, R.J., Vårum, K.M., Smidsrød, O. (1994). Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydrate Polymers*, 23 (4): 253- 260.

Noriega, S.E., Subramanian, A. (2011). Consequences of neutralization on the proliferation and cytoskeletal organization of chondrocytes on chitosan-based matrices. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, Article ID 809743, 1.

Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S., Yamamoto, K., Peck, G.E. (2001). Physical properties and molecular behavior of chitosan films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27: 143-157.

O’brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamarblue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5421-5426.

Odekerken, J.C.E., Welting, T.J.M, Arts, J.J.C., Walenkamp, G.H.I.M., Emans, P.J. (2013). Modern orthopaedic implant coatings- Their pro’s, con’s and evaluation methods. *Modern Surface Engineering Treatments*, Dr. M. Aliofkhazraei (Ed.).

Ogawa, K. (1991). Effect of heating and aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 2375-2379.

Ogawa, K., Yui, T., Okuyama, K. (2004). Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34: 1-8.

Papachroni, Karatzas, D.N., Papavassiliou, K.A., Basdra, E.K., Papavassiliou, A.G. (2009). Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends in Molecular Medicine*, 15 (5): 208-16.

Park, H., Choi, B., Hua, J., Lee, M. (2013). Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 9: 4779-4786.

Peniche Covas, C. A. (2006). Estudios sobre Quitina y Quitosana. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias, La Habana, ISBN 969-16-0433-5.

Peppas, N.A. (1981). Polymer structure and thermodynamic considerations of solute transport in polymer membranes. *ACS*, 182, INDE-94.

Peppas, N.A., Gurny, R., Buri, P.A. (1980). Modelling of drug diffusion through swellable polymeric systems. *Journal of Membrane Science*, 7: 241-253.

Peppas, N.A., Korsmeyer, R.W., Meadows, D.L., Moynihan, H.J., Reinhart, C.T., Franson, N.M., Honey, M.S. (1982). Macromolecular Structure and Solute Diffusion in Membranes. *Proceed. Intern. Symp. Membr. & Membr. Process*, 73.

Percot, A., Viton, C., Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells *Biomacromolecules*, 4 (1): 12-18.

Porstmann, B., Jung, K., Schmechta, H., Evers, U., Pergande, M., Porstmann, T., Kramm, H.J., Krause, H. (1989). Measurement of lysozyme in human body fluids: comparison of various enzyme immunoassay techniques and their diagnostic application. *Clinical Biochemistry*, 22: 349-55.

Pujals, G., Sune-Negre, J.M., Perez, P., Garcia, E., Portus, M., Tico, J.R., Minarro, M., Carrio, J. (2008). *In vitro* evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. *Parasitology Research*, 102: 1243-1247.

Regina, M., Souza, A., Vieira, F. (2012). The chitosan as dietary fiber: an in vitro comparative study of interactions with drug and nutritional substances. *The Complex World of Polysaccharides*, Dr. Desiree Nedra Karunaratne (Ed.), ISBN: 978-953-51-0819-1.

Rengachary, S.S. (2000). Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurgical Focus*, 13, (6).

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31 (7): 603-632.

Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57, (3): 397-430.

Rinaudo, M., Milas, M., Dung, P.L. (1993). Characterization of chitosan: Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15 (5): 281-285.

Robert, G.A.F. (1992). *Chitin Chemistry*, New York, Macmillan press.

Roberts, G.A.F. (2008). Thirty years of progress in chitin and chitosan. Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives. *Polish Chitin Society*, Łódź, Poland. Volume XIII.

Roberts, G.A.F. (1998). Chitosan production routes and their role in determining the structure and properties of the product, in *Advances in Chitin Science*, A. Domard, G.A.F. Roberts, and K.M. Vårum, Editors, Jacques André Publisher: Lyon. 22-31.

Roberts, G.A.F., Domszy, J.G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4 (6): 374-377.

Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C.R., Grenha, A. (2012). Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 3 (3): 615-641.

Sakajari, T., Kikuchi, T., Simon, I., Uchida, k., Yamamura, T., Ishii, T., Yajima, H. (2006). Molecular dynamics approach to study the discrepancies in the thermal behavior of amylose and chitosan conformations. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 764: 133-140.

Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4: 743-765.

Sandford, P.A., Hutchings, G.P. (1987). Chitosan a natural cationic biopolymer. In: *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Properties Relations and Applications*. M. Yalpani (Ed.). Elsevier, Amsterdam, 363–376.

Sannan, T., Kurita, K., Iwakura, Y. (1975). Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. *Die Makromolekulare Chemie*, 176 (4): 1191-1195..

Santos, T.C., Marques, A.P., Silva, S.S. (2007). *In vitro* evaluation of the behaviour of human polymorphonuclear neutrophils in direct contact with chitosan-based membranes. *Journal of Biotechnology*, 132 (2): 218–226.

Schatz, C., Sorlier, P., Viton, C., Domard, A. (2003). Relation between the cationicity of glucosamine residues and the interactions involving chitin and chitosan. *ChemInform*, 34-39.

Scheufler, C., Sebald, W., Hulsmeier, M. (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 287: 103-115.

Schliephake, H. (2010). Application of bone growth factors-the potential of different carrier system. *Oral Maxillofacial Surgery*, 14: 17-22.

Schmierer, B., Hill, C.S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 970-982.

Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textil Research Journal*, 29: 786-794.

Shahbazi-Gahrouei, D., Nikzad, S. (2011). Determination of organ doses in radioiodine therapy using medical internal radiation dosimetry (MIRD) method. *Journal of Radiation Research*, 8 (4): 249-252.

- Shigemasa, Y., Saito, K., Sashiwa, H., Saimoto, H. (1994). Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16 (1): 43-49.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., Knauss, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine and Growth Factors Reviews*, 20: 343-355.
- Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., Mikos, A.G. (2001). Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 22: 2581-2593.
- Singla, A.K., Chawla, M. (2001) Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 53 (8): 1047-1067.
- Spetz, J., Rudqvist, N., Forssell-Aronsson, E. (2013). Biodistribution and Dosimetry of Free ²¹¹At, ¹²⁵I and ¹³¹I in Rats. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals*, 28 (9):657-64.
- Stein, G.S., Lian, J.B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews*, 14: 424-442.
- Struszczyk, M.H. (2011). Application of chitosan in medical devices design. http://www.stepitn.eu/wp-content/uploads/2011/03/PM_30_Lodz_Struszczyk.pdf.
- Struszczyk, M.H., Struszczyk, K.J. (2007). Polish Chitin Society, Monograph XII.
- Sykaras, N., Opperman, L.A. (2003). Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science*, 2 (45): 57-73.
- Tamada, J.A., Langer, R. (1993). Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers. *Proceedings of National Academy of Science*, 90 (2): 552-56.
- Tan, H., Chu, C.R., Payne, K., Marra, K.G. (2009). Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30 (13): 2499-2506.

Tanabe, T., Kazuko, M., Tamo, F., Masaru, M. (2003). Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 67 (2): 354-364.

Tokura, S., Ueno, K., Miyazaki, S., Nishi, N. (1997). Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromolecular Symposia*, 120: 1-9.

Tomihata, K., Ikada Y. (1997) *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*, 18: 567–75.

Tommeraas, K., Varum, K.M., Christensen, B.E., Smidsrod, O. (2001). Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohydrate Research*, 333 (2): 137-144.

Tsaih, M.L., Chen, Y. R.H. (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal Applied Polymer Science*, 88 (13): 2917-2923.

Tuan, R.S., Boland, G., Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*, 5 (1): 32-46.

UE Nº 432/2012. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4663), reduction of intestinal transit time (ID 4664) and reduction of inflammation (ID 1985) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006.

Ueno, K., Yamaguchi, T., Sakairi, N., Nishi, N., Tokura, S. (1997). *Advances in chitin science*.156.

Ullberg, S. (1954). Studies on the distribution and fate of 35S-labelled benzylpenicillin in the body. *Acta Radiológica Supplementum*, 188: 1-110.

Vårum, K.M., Holme, H.K., Izume, M., Torger- Stokke B., Smidsrød, O. (1996). Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1291 (1): 5-15.

Vårum, K.M., Myhr, M.M., Hjerde, R.J., Smidsrød, O. (1997). *In vitro* degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research*, 299 (1-2): 99-101.

Wang, W., Bo, S., Li, S., Qin, W. (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13 (5): 281-285.

Weiner, M.L. (1992). An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. In *Advances in Chitin and Chitosan* (Eds, Brine, C.J., Sandford, P.A. y Zikakis, J.P.), 663-670.

Weinhold, M.X., Sauvageau, J.C.M., Keddig, N., Matzke, M., Tartsch, B., Grunwald, I., Kübel, C., Jastorff, B., Thöming, J. (2009). Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. *Green Chemistry*, 11: 498-509.

Wiesmann, H.P., Meyer, U., Plate, U., Hohling, H.J. (2005). Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *International Review of Cytology*, 242: 121-156.

Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534.

Xia, W., Liu, P., Zhang, J., Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25: 170-179.

Xu, Y., Gallert, C., Winter, J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79 (4): 687-697.

Yamaguchi, A., Komori, T., Suda, T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine Reviews*, 21: 393-411.

Yuan, N.-Y., Tsai, R.-Y., Ho, M.-H., Wang, D.-M., Lai, J.-Y., Hsieh, H.-J. (2008). Fabrication and characterization of chondroitin sulfate-modified chitosan membranes for biomedical applications. *Desalination*, 234: 166-174.

Yuan, Y., Lee, T.R. (2013). Contact Angle and Wetting Properties. G. Bracco, B. Holst (eds.), Surface Science Techniques. *Springer Series in Surface Sciences*, 51.

Yun, Y-P., Yang, D.H., Kim, S-W., Park, K., Ohe, J-Y., Lee, B-S., Choi, B-J., Kim, S.E. (2014). Local delivery of recombinant human bone morphogenic protein-2 (rhBMP-2) from rhBMP-2/heparin complex fixed to a chitosan scaffold enhances osteoblast behavior. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11 (2): 163-170.

Zuo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C., Li, P. (2006). Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Research*, 341: 351–354.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características principales del quitosano y sus aplicaciones en biomedicina.	43
Tabla 2. Algunos ejemplos comerciales de quitina y quitosano en biomedicina.	44
Tabla 3. Tipos celulares del tejido óseo.	53
Tabla 4. Radioisótopos empleados en estudios biocinéticos.	67
Tabla 5. Contenido de humedad, cenizas e insolubles de las muestras de quitosano.	98
Tabla 6. Contenido de metales pesados Pb y Hg, y porcentajes de carbono y nitrógeno.	99
Tabla 7. Resultados de Índice de cristalinidad, grado de desacetilación, peso molecular, viscosidad rotacional y viscosidad intrínseca de todos los quitosanos.	102
Tabla 8. Resultados del ajuste lineal del espesor (μm) del filme obtenido en función de la concentración para cada quitosano.	110
Tabla 9. Valores obtenidos del ajuste de los datos de proliferación del ensayo con MTS y AB empleando Q11-1,0%.	142
Tabla 10. Valores de $t_{1/2}$ obtenidos de la cinéticas de liberación para cada una de las concentraciones de polímero empleadas en los filmes.	177
Tabla 11. Parámetros obtenidos de los ajustes de las cinéticas de liberación de la proteína al medio.	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la estructura secundaria de la proteína, BMP-2.	24
Figura 2. Esquema de la ruta de señalización celular de la BMP-2 vía Smad.	25
Figura 3. A) Radiografía de implantes dentales colocados en tibia de conejo, a su derecha los implantes activados con filmes de quitosano y rhBMP-2, a su izquierda, los implantes control. La tibia izquierda se corresponde con los implantes control (sin recubrimiento). B) Imagen de μ -CT del implante dental superior de la tibia derecha.	28
Figura 4. Estructura química de la quitina destacando su grupo acetamido.	29
Figura 5. Esquema simplificado de la obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos.	30
Figura 6. Estructura química del quitosano enmarcando su grupo amino libre.	31
Figura 7. Métodos de obtención de quitosano mediante desacetilación de la quitina.	32
Figura 8. Modelo de las estructuras cristalinas de quitosano totalmente desacetilado (A1 y A2) y de hidrocloreuro de quitosano (B1 y B2).	34
Figura 9. Representación esquemática del centro catalítico de la enzima quitosanasa y los diferentes enlaces que reconoce.	37
Figura 10. Mecanismo de acción de la enzima lisozima.	38
Figura 11. Imagen representativa de la influencia del DD y distribución de los grupos acetilo en la degradación del polímero <i>in vitro</i> .	39
Figura 12. Liberación de Factores de crecimiento en aplicaciones biológicas.	47
Figura 13. Diferentes preparaciones de filmes de quitosano con aplicación en medicina.	48
Figura 14. Imagen del tejido óseo esponjoso y compacto y los diferentes elementos que los componen.	51
Figura 15. Proceso de remodelación celular.	56
Figura 16. Etapas de la reparación de una fractura ósea.	58
Figura 17. Etapas del proceso de adhesión celular.	60
Figura 18. Microfotografía correspondiente a un corte histológico teñido con HE donde se aprecian los diferentes tipos celulares.	64
Figura 19. Estudio compartimental del yodo propuesto por R. W. Leggett (2010).	68
Figura 20. Fotografía de un corte liofilizado de una rata entera y su autorradiografía.	69
Figura 21. Ejemplo del espectro de un quitosano empleado para la determinación del DD.	80
Figura 22. Ejemplo del difractograma de rayos X de un quitosano.	81
Figura 23. Espectro de FT-IR de quitina (A) y de quitosano (B).	82
Figura 24. Ejemplo representativo de la curva de calibrado del método de Bradford.	86
Figura 25. Imagen de un filme de quitosano inserto en un bastidor y a su derecha un bastidor control sin filme.	89

Figura 26. Imágenes de la operación del estudio mediante μ -CT, empleando filmes de quitosano a ambos lados de la columna y un marcador de POM-C para reconocer la localización exacta de la muestra.	91
Figura 27. Imagen de un filme de quitosano con proteína marcada con I^{125} .	92
Figura 28. Difractograma de rayos X de las muestras en orden descendente aproximado de cristalinidad donde se aprecian los picos a 2θ propios del polímero (flechas).	100
Figura 29. Espectro de 1H -RMN del quitosano Q5.	101
Figura 30. Ajuste comparativo de los valores obtenidos de la viscosidad intrínseca frente a la rotacional.	103
Figura 31. Preparación de filmes de quitosanos.	104
Figura 32. Espectro Infrarrojo FTIR-ATR de los filmes donde se aprecian bandas características del quitosano.	105
Figura 33. Estudio de la superficie de los filmes.	106
Figura 34. Ajuste lineal de los valores de rugosidad (S_a) frente a la concentración.	107
Figura 35. Ajuste lineal de los valores de rugosidad de todos los filmes de quitosanos reagrupados en función del su Mw.	108
Figura 36. Determinación del espesor de filmes de Q11 preparados a diferentes concentraciones.	109
Figura 37. Representaciones del ajuste lineal de los valores de espesor de todos los filmes de quitosano en función de la concentración de polímero empleado.	111
Figura 38. Representación de los valores de ángulo de contacto (θ) del filme de Q5 en función de la concentración.	112
Figura 39. Representación de los valores θ de todos los filmes de quitosano.	113
Figura 40. Porcentaje de hinchamiento de los filmes de Q1, Q5 y Q9 (al 1,0%) y representativos de los diferentes grupos de Mw en medio PBS a pH 7,4.	114
Figura 41. Porcentaje de hinchamiento de los filmes de Q1, Q5 y Q9 (al 1,0%) en medio AcH/AcONa a pH 5,4.	115
Figura 42. Degradación de la solución de Q11 (1,0 %) en medio ácido (tampón AcH/AcONa) y enzima quitosanasa (0,0345 μ g/ml) durante 21 días.	116
Figura 43. Degradación de los filmes de Q11 (1,0%) en medio ácido (tampón AcH/AcONa) y enzima quitosanasa (0,0345 μ g/ml) durante 21 días.	117
Figura 44. Degradación ácida (A) y degradación ácida y enzimática (B) de la solución y de los filmes del Quitosano Q11 en tampón AcH/AcONa a (pH 5,4, 37 °C y 55 rpm) durante 21 días.	119
Figura 45. Degradación del quitosano Q11 (1,0%) durante 21 días, A (en solución) y B (filmes) con y sin enzima en presencia de medio ácido (tampón AcH/AcONa, pH 5,4, 37 °C y 55rpm).	120
Figura 46. A) Degradación de los filmes de Quitosano Q11 expresada en porcentaje empleando tampón AcH/AcONa (a pH 5,4) con y sin lisozima durante 21 días. B) El ajuste de los mismos al 100%.	121

Figura 47. Degradación ácida (A) y degradación ácida y enzimática (B) de la solución y de los filmes del quitosano Q1 (al 1,0% de alto Mw) empleando las mismas condiciones experimentales anteriormente descritas.	122
Figura 48. Ajuste a una fase exponencial del proceso de degradación de los filmes de quitosano Q1 (Alto Mw) empleando tampón AcH/AcONa a pH 5,4 con y sin enzima lisozima.	123
Figura 49. Ajuste a una fase exponencial del proceso de degradación de los filmes de quitosano Q1 (alto Mw) empleando tampón AcH/AcONa a pH 5,4 con y sin enzima lisozima expresado en porcentaje.	123
Figura 50. Degradación ácida (A) y degradación ácida y enzimática (B) de la solución y de los filmes del quitosano Q5 de Mw intermedio en las mismas condiciones anteriormente descritas.	124
Figura 51. Ajuste a una fase exponencial del proceso de degradación de los filmes de quitosano Q5 (Mw Intermedio) en AcH/AcO (pH 5,4) con y sin enzima lisozima.	125
Figura 52. Ajuste a una fase exponencial del proceso de degradación de los filmes de quitosano Q5 (Mw Intermedio) en AcH/AcO (pH 5,4) con y sin enzima lisozima.	125
Figura 53. Degradación ácida de los filmes de quitosano durante 21 días de ensayo mostrándose ejemplos de los tres diferentes grupos de quitosanos en función del Mw.	127
Figura 54. Degradación ácida y enzimática de los filmes de los quitosanos agrupados en función de su Mw, durante 21 días de ensayo.	128
Figura 55. A) Degradación de los filmes de quitosano preparados a partir de diferentes concentraciones de polímero a las 24h en tampón acético acetato en agitación a 37 °C. B) Ajuste obtenido de los quitosanos de Mw bajo e intermedio (Q2, Q5 y Q9).	130
Figura 56. Fotografías de los recipientes correspondientes al ensayo de degradación ácida y enzimática una vez finalizado el tiempo de incubación (se muestran solo a modo de ejemplo las primeras 24 horas).	131
Figura 57. Representación de la viscosidad de las disoluciones obtenidas de los restos de los filmes que proceden del ensayo de degradación ácida y enzimática.	132
Figura 58. Representación de la viscosidad de la disolución en contacto con filmes de quitosano Q12 (1,0%) en tampón fosfato (PBS, pH 7,4 a 37 °C) durante los 21 días de ensayo.	132
Figura 59. Determinación de la proliferación celular sobre los filmes de quitosano mediante ensayo de Bradford.	135
Figura 60. Determinación de la proliferación celular sobre filmes de quitosano mediante ensayo de MTS.	137
Figura 61. Determinación de la proliferación celular sobre filmes de quitosano mediante ensayo de AB.	139
Figura 62. A) Representación del ajuste lineal de los datos obtenidos para los quitosanos de Mw intermedio y bajo. B) Ajuste conjunto de regresión para los quitosanos de bajo Mw.	141
Figura 63. Resultados de la proliferación de la línea celular C2C12 sembradas sobre PC y filmes de quitosano (Q11-1,0%) en función del tiempo empleando el ensayo de MTS (A) y AB (B).	142

Figura 64. Seguimiento de la morfología celular de las C2C12 sobre PC y filmes de Q11.	143
Figura 65. Estudio de la adhesión celular de la línea C2C12 sembrada sobre quitosano (0,25%) y PC en función del tiempo.	144
Figura 66. Determinación de los niveles de fluorescencia en el proceso de adhesión.	145
Figura 67. Representación de la regresión lineal de los datos obtenidos en el ensayo de adhesión sobre diferentes quitosanos.	147
Figura 68. Adhesión de todos los quitosanos al 1,0% reagrupados en función de su Mw tras 4 horas de incubación mediante la determinación de la actividad metabólica del ensayo de AB.	148
Figura 69. Imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia obtenidas tras el ensayo de adhesión sobre filmes de diferentes concentraciones de Q11.	149
Figura 70. Aumentos de las microfotografías tras el ensayo de adhesión (Q11-1,0%).	150
Figura 71. Determinación de las proteínas totales del cultivo celular (4 días) sobre filmes con 5 µg de rhBMP-2 y sin ella expresados en porcentaje respecto a sus PC.	151
Figura 72. Imágenes de microscopía óptica de distintos tipos de filmes de quitosanos (0,25%) con y sin proteína (10 µg) a las 24 de incubación celular.	153
Figura 73. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina tras 4 días de cultivo de C2C12 crecidas sobre filmes a activados con proteína rhBMP-2 (5 µg).	154
Figura 74. Representación de los resultados de ALP y Proteínas totales para los diferentes quitosanos (0,25%) con respecto al PC.	155
Figura 75. Representación de los resultados de ALP (%)/Bradford (%) de los quitosanos agrupados en función de su Mw y como excepción el Q12 con un elevado DD.	156
Figura 76. Cantidad de proteínas totales (A) y actividad ALP de las células C2C12 cultivadas sobre filmes de quitosano (Q9-1,0%) en función de la concentración de proteína rhBMP-2.	158
Figura 77. Microfotografías de las células C2C12 sembradas sobre los filmes Q9 (1,0%) con y sin proteína.	159
Figura 78. Cantidad de proteínas totales (A) y actividad ALP (B) de las células C2C12 sembradas sobre filmes de quitosano.	161
Figura 79. Microfotografías de los cultivos de C2C12 sobre los filmes sin proteína y con 100 µg de rhBMP-2, empleando un microscopio de óptica inversa.	162
Figura 80. Representación del ajuste obtenido de la curva dosis-respuesta de la actividad ALP inducida sobre células C2C12 por concentraciones conocidas de proteína rhBMP-2..	165
Figura 81. Cantidad de rhBMP-2 liberada desde filmes (Q11-0,25%) cargados con proteína (5 µg) y cantidad de proteína retenida por los mismos.	167
Figura 82. Cantidad de rhBMP-2 liberada desde filmes (Q11-0,25%) cargados con proteína (10 µg) y cantidad de proteína retenida por los mismos, no liberada, en función del tiempo.	170
Figura 83. Cantidad de rhBMP-2 liberada desde filmes (Q11-0,25%) cargados con proteína (A: 20 µg, B: 50 µg, C: 100 µg) y cantidad de proteína retenida por los mismos (no liberada) en función del tiempo.	172

Figura 84. Representación de los ajustes de liberación de rhBMP-2 presente en los medios de liberación para todas las cargas iniciales de proteína en los filmes (5, 10, 20, 50 y 100 µg).	173
Figura 85. Representación de la vida media ($t_{1/2}$) en función de la carga inicial en el filme (excepto para filmes con 5 µg).	174
Figura 86. Representación de la vida media ($t_{1/2}$) en función de la carga inicial en el filme (excepto para filmes con 5 µg) frente al inverso de la concentración.	175
Figura 87. Cantidad de proteína retenida en los filmes Q11, cargados inicialmente con 10 µg y preparados con diferentes concentraciones de polímero (A: 0,25% y B: 1,0%).	176
Figura 88. Cantidad de proteína determinada en los medios de liberación en función del tiempo con filmes preparados con diferentes concentraciones de polímero pero la misma carga de proteína (10 µg).	177
Figura 89. A) Representación del $t_{1/2}$ frente a las concentraciones efectivas de proteína para los filmes obtenidos con diferentes cantidades de polímero y misma carga de proteína (10 µg). B) Ajuste lineal del $t_{1/2}$ vs la inversa de la concentración inicial efectiva en cada filme.	178
Figura 90. Cantidad de proteína remanente en los filmes de dos quitosanos (Q1 y Q4 al 0,25%) con 20 µg proteína inicial.	179
Figura 91. Cantidad de proteína rhBMP-2 presente en los filmes cargados con 20 µg durante las primeras 24h de los quitosanos (0,25%).	180
Figura 92. Determinación de la cantidad de proteína liberada en los medios con filmes de quitosano Q1 (0,25%) cargados con 20 µg de factor.	181
Figura 93. Cantidad de proteína presente en los medios de liberación a partir de quitosanos diferentes a una misma concentración (0,25%) y una misma cantidad de proteína (20 µg).	183
Figura 94. Imagen que muestra de izquierda a derecha, una muestra extraída a los 7 días de tejido muscular de rata tras su fijación en PFA (4%), el bastidor sin muestra y el tejido a analizar.	186
Figura 95. Tinción de HE de la degradación del filme de Q11 (0,25%) a los 3 días post-cirugía.	187
Figura 96. Tinción de HE de la degradación del filme de Q11 (0,25%) a los 7 días post-cirugía.	188
Figura 97. Tinción de HE de la degradación del filme de Q11 (0,25%) a los 21 días post-cirugía.	189
Figura 98. Tinción de HE de la degradación del filme de Q11 (0,25%) a los 42 días post-cirugía.	189
Figura 99. Tinción de HE del efecto de aislamiento del filme en función del tiempo.	190
Figura 100. Bastidores retirados tras 3 (A) y 21 días (B) de implantación.	191
Figura 101. Tinción de HE de la colonización celular sobre los filmes de quitosano.	192
Figura 102. Tinción de HE de la degradación de los diferentes filmes tras 42 días post cirugía.	194
Figura 103. Imágenes de HE (en las filas superiores) y TCM (en la fila inferior) de filmes de Q11 (1,0%) con diferentes cantidades de proteína rhBMP-2 a los 21 días de la post-cirugía.	195

Figura 104. Ampliación de la imagen obtenida mediante tinción de HE y TCM del filme cargado con 100 µg de proteína, (escala 200 µm) visualizándose los osteocitos (flecha negra) en el interior de las lagunas, y osteoblastos (flechas azules) rodeados nuevo tejido óseo (A) y de fibras de colágeno (B).	196
Figura 105. Imágenes de µ-CT de la formación de nuevo tejido óseo ectópico en función del tiempo para una misma concentración de proteína rhBMP-2 en el filme (20 µg).	198
Figura 106. Imágenes de µ-CT de la formación de nuevo tejido óseo ectópico en función del tiempo para una misma concentración de proteína rhBMP-2 en el filme (10 µg).	199
Figura 107. Imágenes de µ-CT de la formación de nuevo tejido óseo ectópico en función del tiempo para una misma concentración de proteína rhBMP-2 en el filme (100 µg).	200
Figura 108. Imágenes de µ-CT de la evolución de la formación de nuevo tejido óseo ectópico en función de la concentración de proteína rhBMP2 a las 6 semanas post-cirugía.	200
Figura 109. Reconstrucción 3D mediante el Programa Volview 3.0 de la formación de nuevo tejido óseo ectópico para una misma concentración de proteína en el filme (20 µg) hasta la sexta semana post cirugía.	201
Figura 110. Estudio de la formación de hueso mediante la determinación del volumen de interés (VOI) por la intensidad de la señal empleando 10, 20 y 100 µg de proteína.	202
Figura 111. Estudio de la formación de hueso mediante el empleo de tres quitosano diferentes Q1, Q5 y Q9 a una misma concentración (0,5%) hasta la sexta semana.	203
Figura 112. Dosis acumulada de las muestras recogidas de orina y heces de cada animal experimental.	206
Figura 113. Velocidad de excreción del ¹²⁵ I en función del tiempo de cada rata (n=1).	208
Figura 114. Imágenes del corte liofilizado de cuerpo entero del animal sacrificado a las 24 horas post-operación y abajo su imagen digital correspondiente de dos cortes diferentes.	210
Figura 115. Imágenes de un corte liofilizado representativo y las imágenes digitales obtenidas a los 3, 7 y 10 días de ensayo.	211

ANEXO I

ANEXO I. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de quitosanos comerciales.

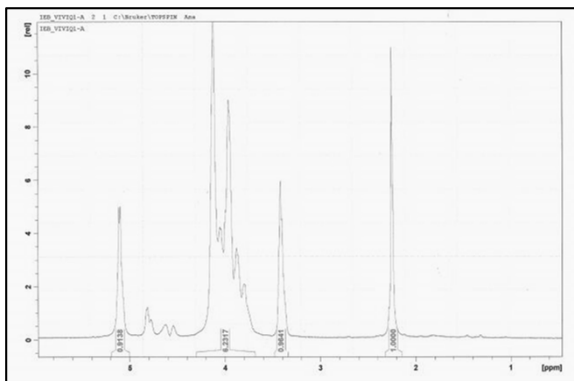
Casa comercial	Ensym	Biolog	Primex	Biochemicals	Dalwoo	Biolog
Especificaciones	(Grado Industrial)	(Grado cosmético)	(Grado Alimentario)	(Grado Médico)	(Grado Farmacéutico)	(Grado farmacéutico)
Apariencia	Polvo, escamas blanco	Blanco-amarillo a blanco-marrón	Polvo o escamas blanco amarillento	Polvo escamas, blanco.	Polvo, escamas, blanco-amarillo	Polvo, blanco amarillo.
Humedad (%)	≤ 13	≤ 15	≤ 10	≤ 8	≤ 10	≤ 10
Cenizas (%)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0,2	≤ 1
Proteínas (%)	-----	-----	-----	-----	≤ 0,3	≤ 0,5
Insolubles (%)	-----	-----	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 2
Viscosidad (mPa.s)*	900-3000	≤ 7	≥ 5	50-800	≤ 5	8-15
GD (%)	82-88	87,6-92,5	> 70	≥ 90	70-100	87,6-92,5
Metales pesados (ppm)	≤ 50	≤ 40	Pb ≤ 0,1 Hg ≤ 5 ppb	≤ 15	Pb ≤ 10 As ≤ 10	Pb ≤ 20 Hg ≤ 0,2 Cd ≤ 0,5 As ≤ 0,5
Peso Molecular(KDa)	-----	-----	-----	-----	-----	20-100 (GPC)
Parámetros Microbiológicos	-----	-----	Ausencia de E.coli, <i>Salmonella</i> sp, y bacteria coliforme	≤1000 ufc/g bacterias totales	Ausencia de E.coli, <i>Salmonella</i> sp, y bacteria coliforme	≤1000 ufc/g bacterias totales. ≤100/g Levaduras y hongos

*(1% p/v en 1% ácido acético v/v)

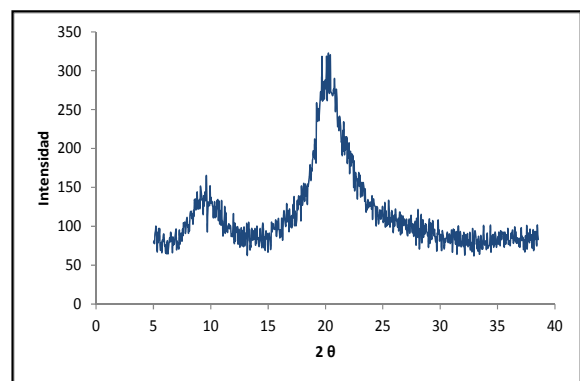
ANEXO II.

QUITOSANO 1 (Q1)

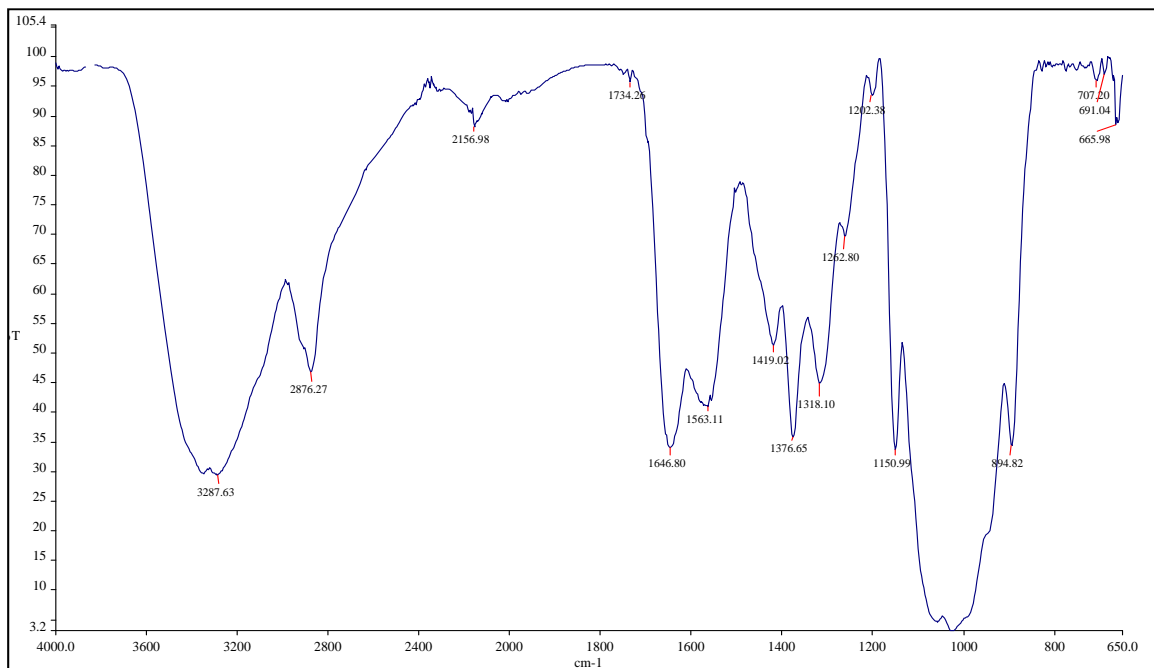
Q85/1000/A



Espectro de ^1H NMR



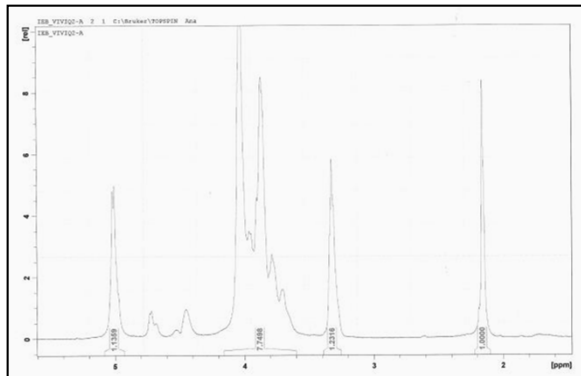
Difractograma de rayos X



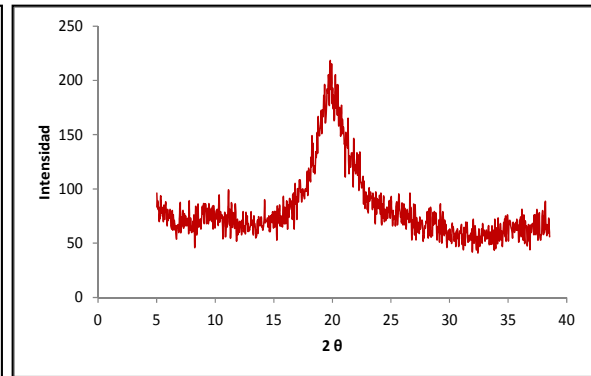
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 2 (Q2)

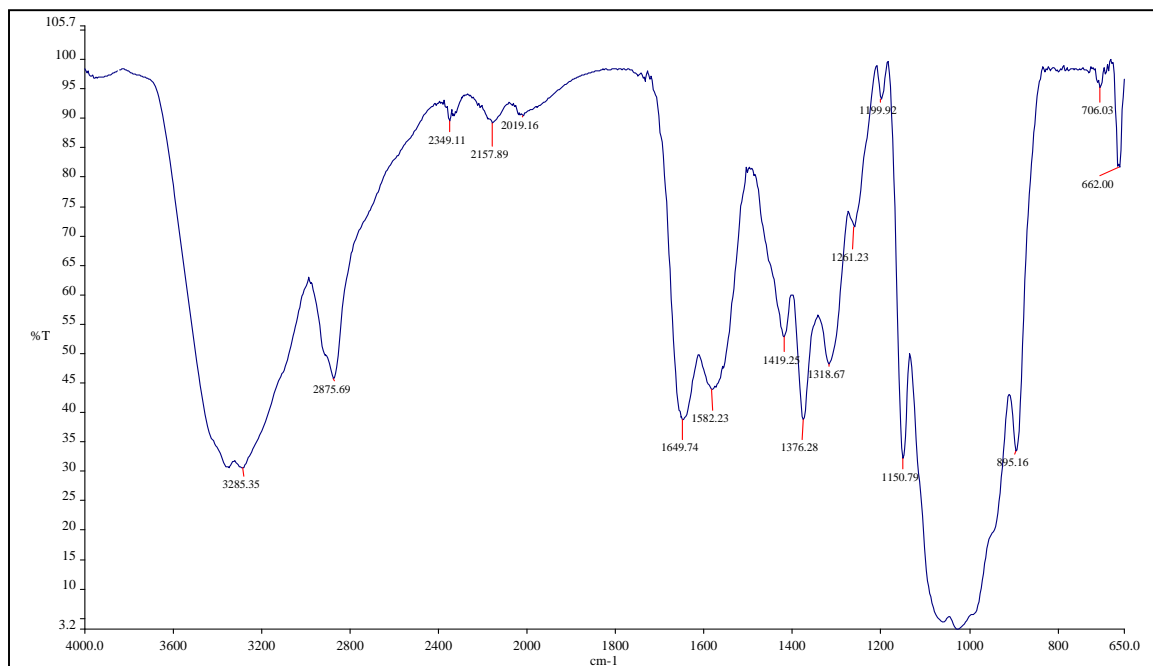
Q80/1000/A1



Espectro de ¹H NMR



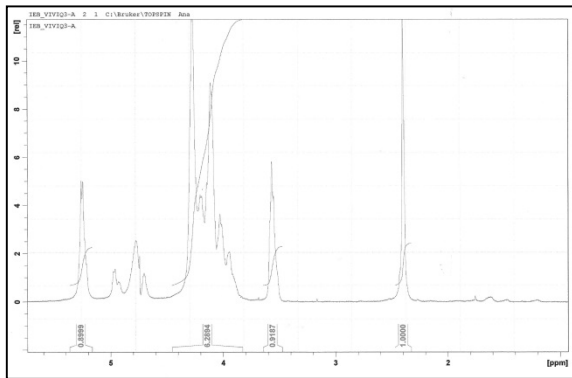
Difractograma de rayos X



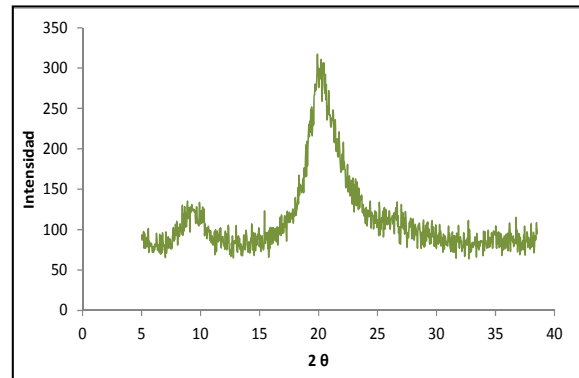
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 3 (Q3)

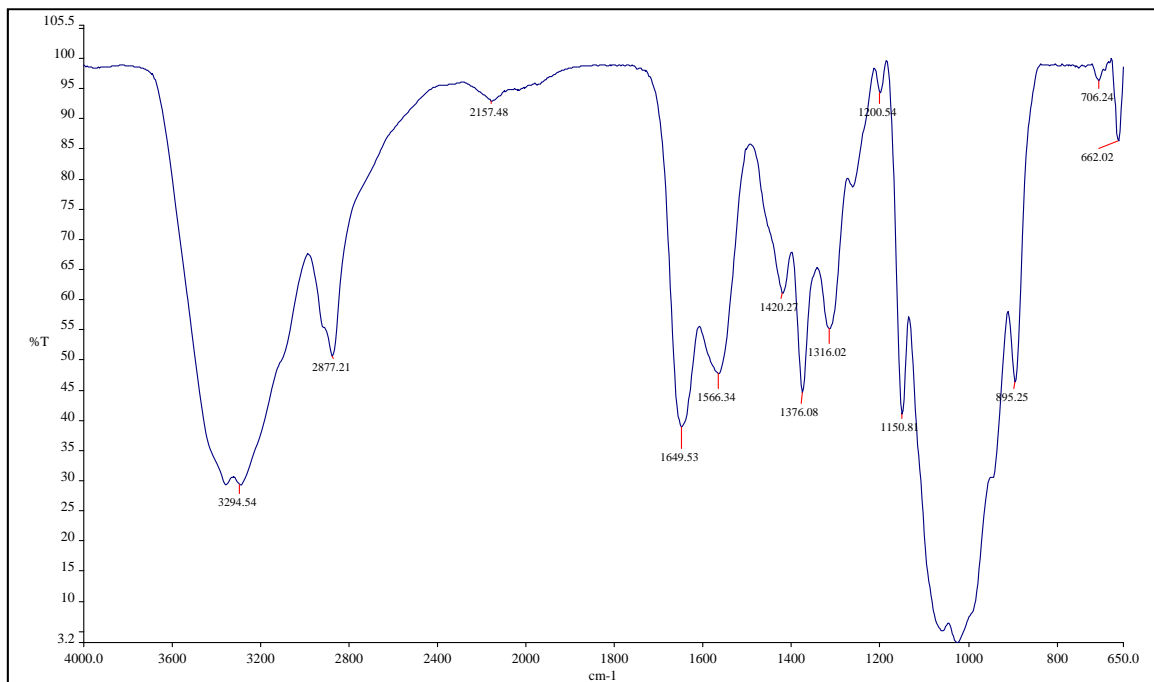
Q90/1000/A1



Espectro de ¹HNMR



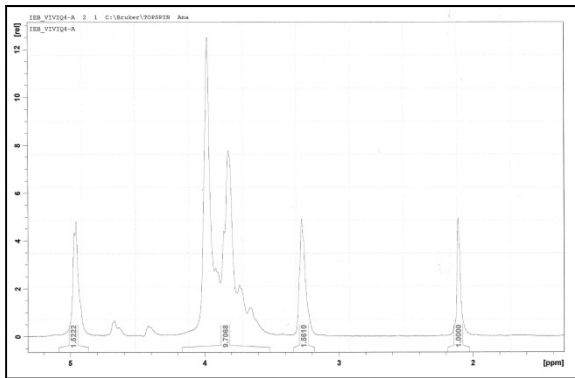
Difractograma de rayos X



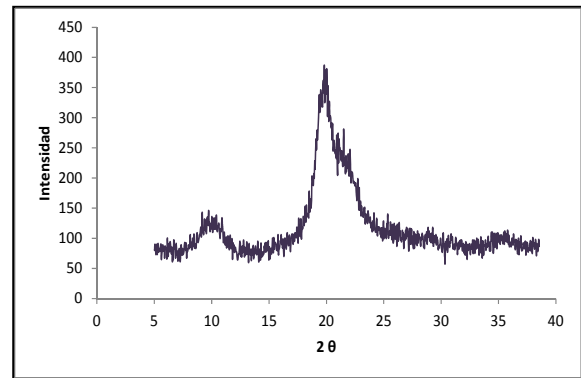
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 4 (Q4)

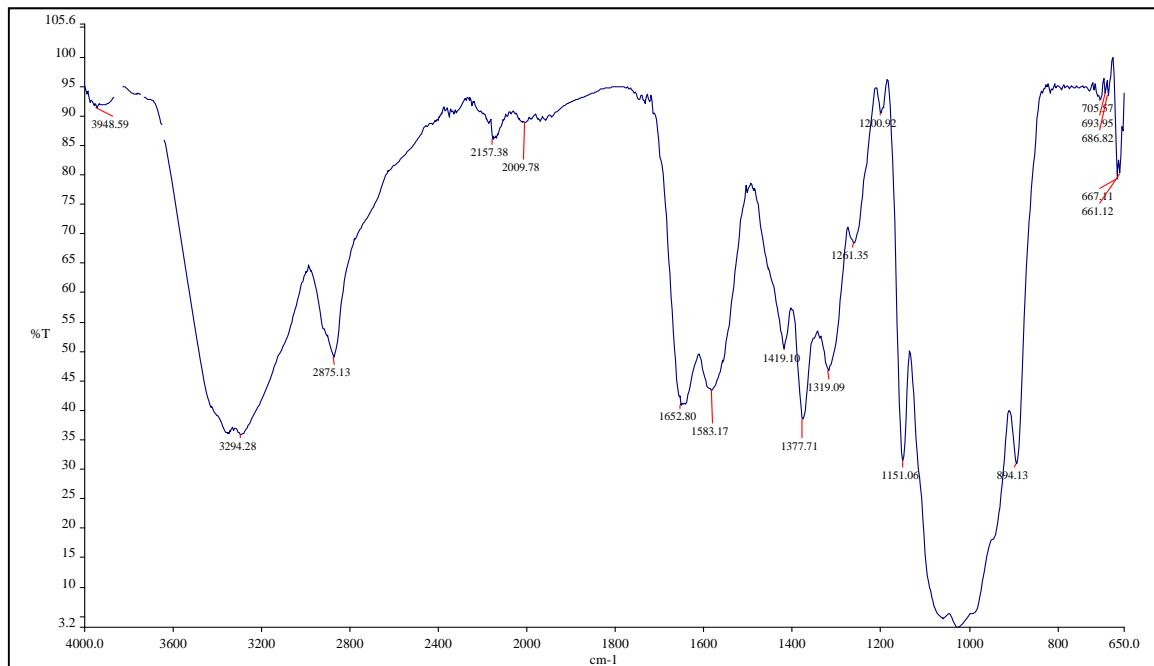
Q85/15/A1



Espectro de ¹H NMR



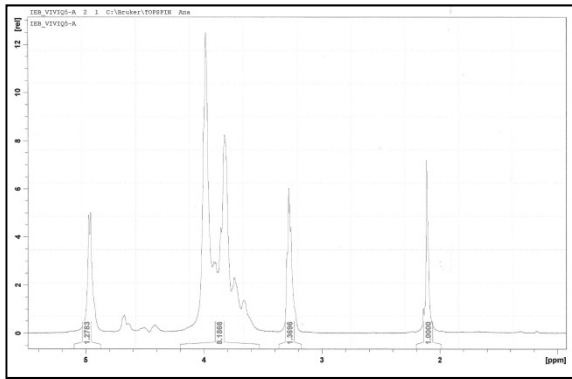
Difractograma de rayos X



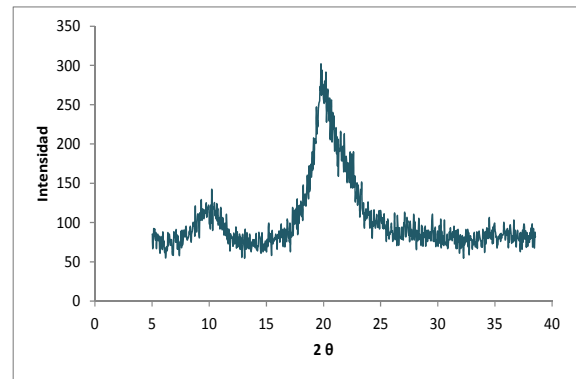
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 5 (Q5)

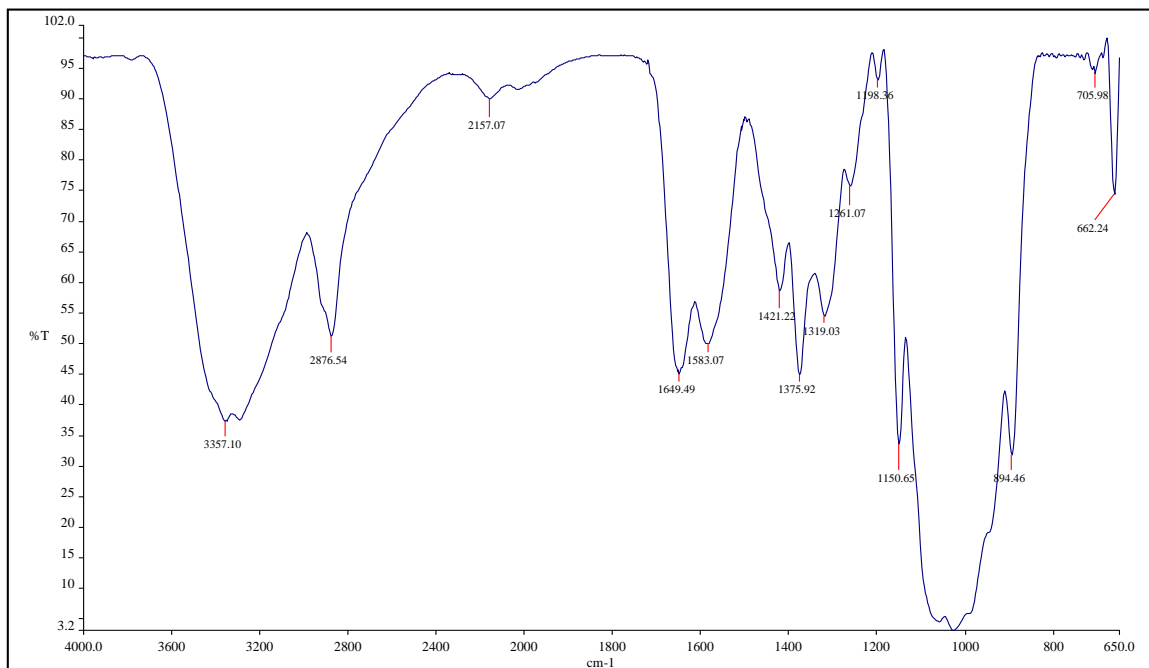
Q85/200/A1



Espectro de ¹HNMR



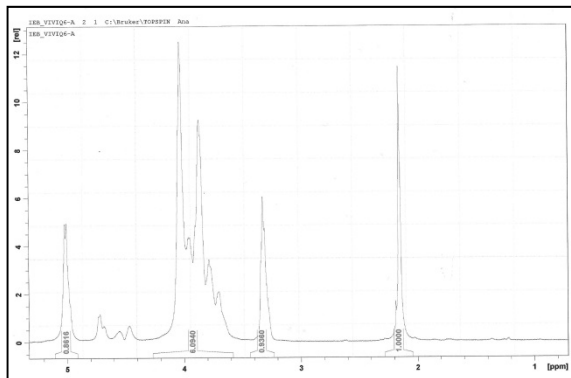
Difractograma de rayos X



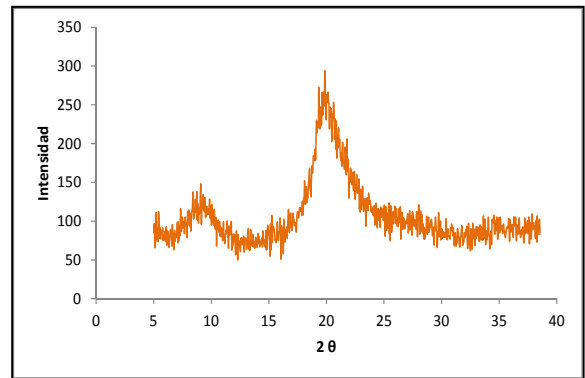
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 6 (Q6)

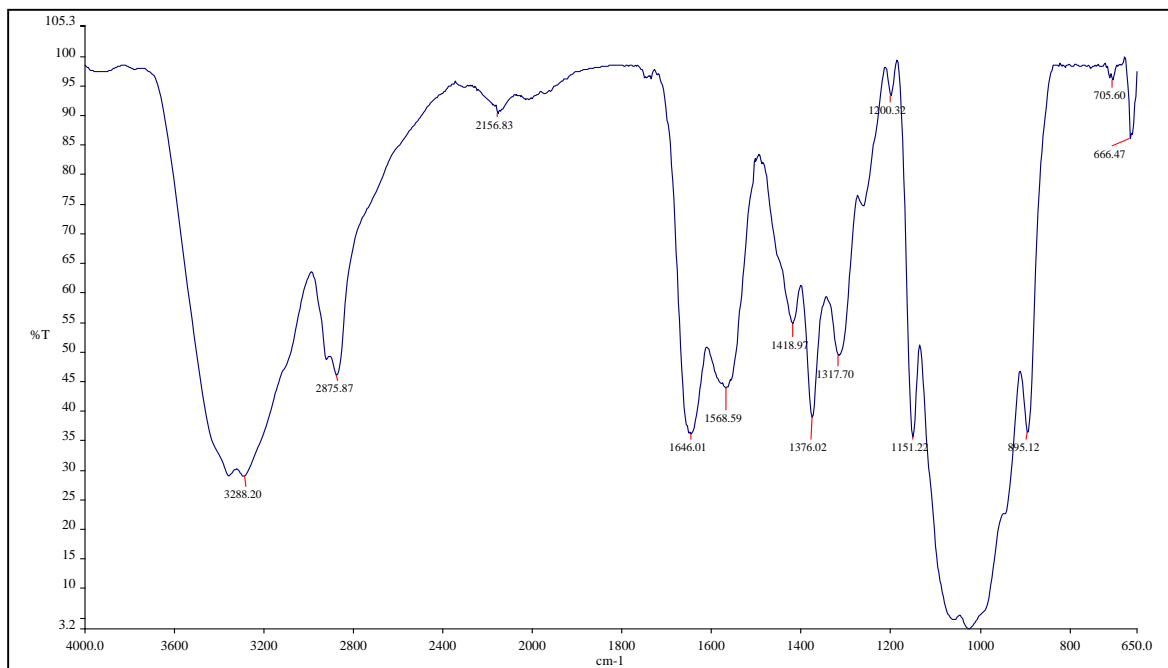
Q85/2000/A1



Espectro de ^1H NMR



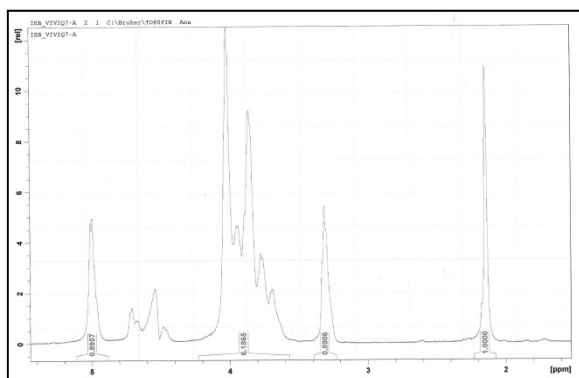
Difractograma de rayos X



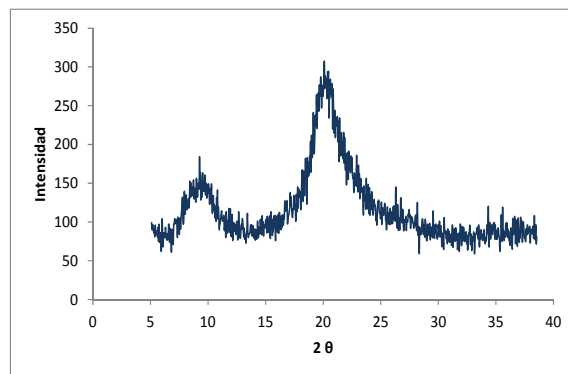
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 7 (Q7)

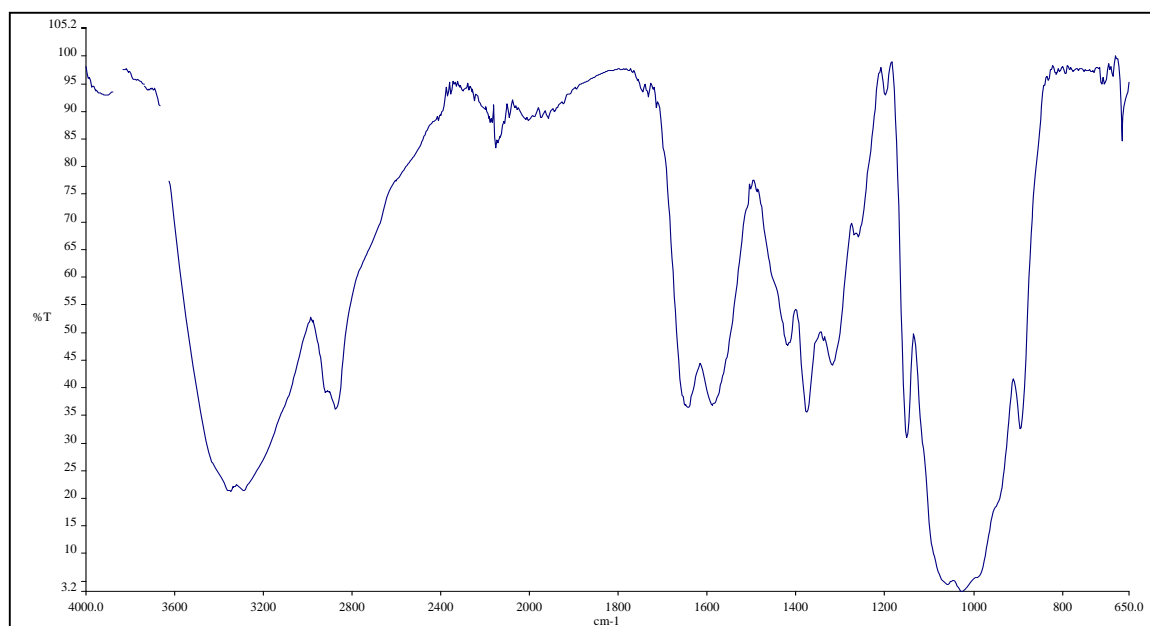
Q85/3000/A1



Espectro de ^1H NMR



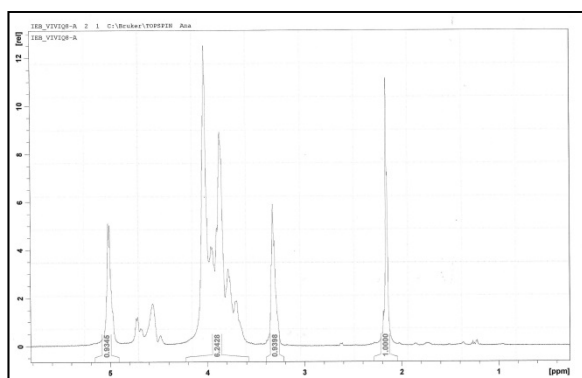
Difractograma de rayos X



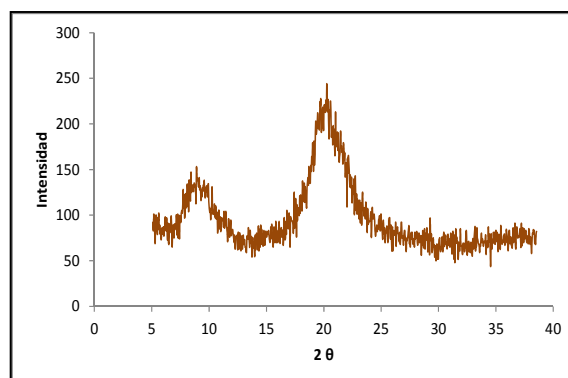
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 8 (Q8)

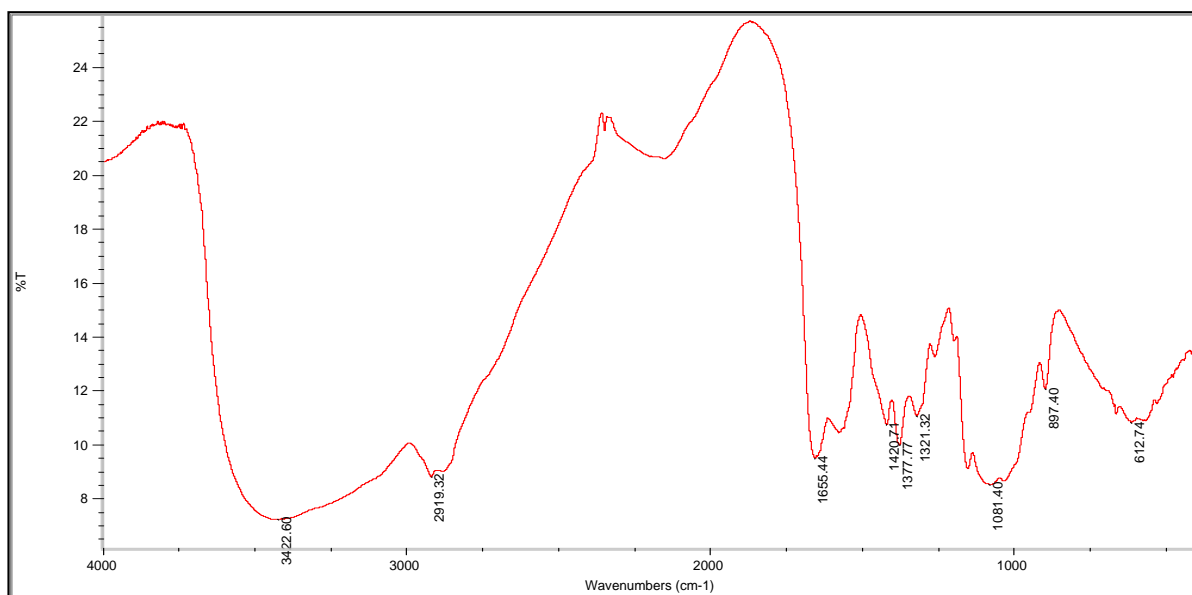
Q85/6000/A1



Espectro de ^1H NMR



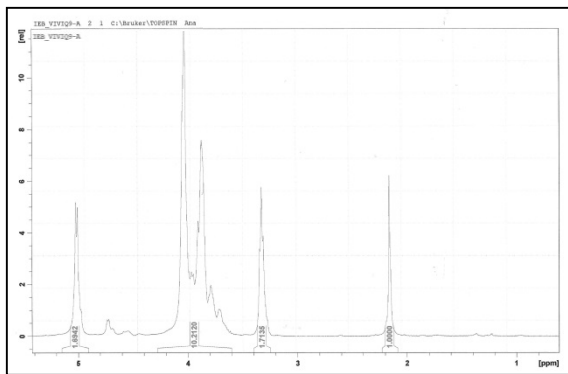
Difractograma de rayos X



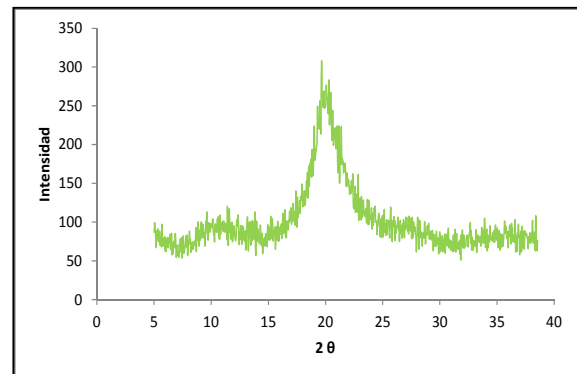
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 9 (Q9)

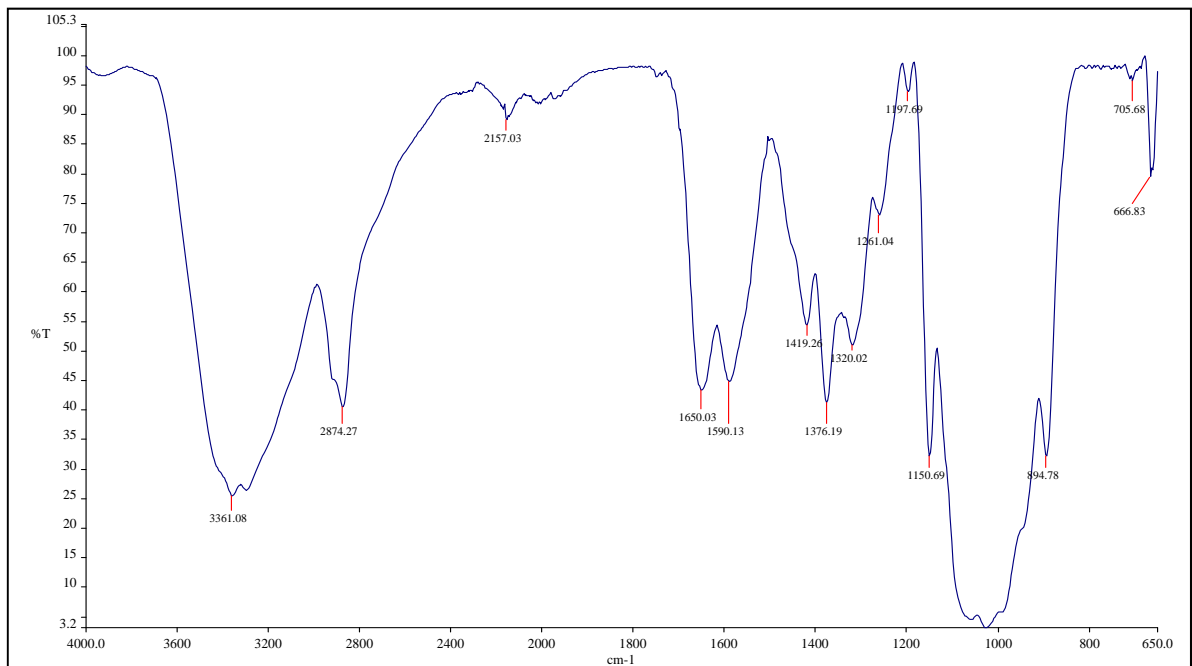
Q85/120/A1



Espectro de ^1H NMR



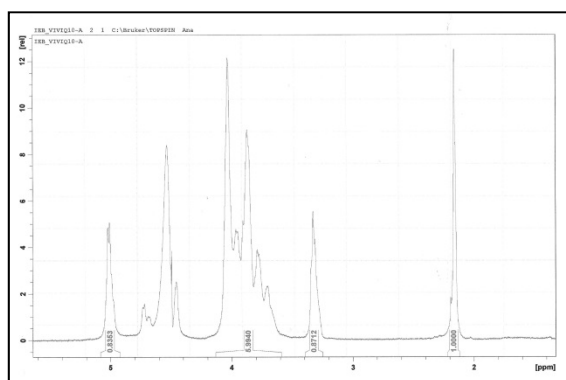
Difractograma de rayos X



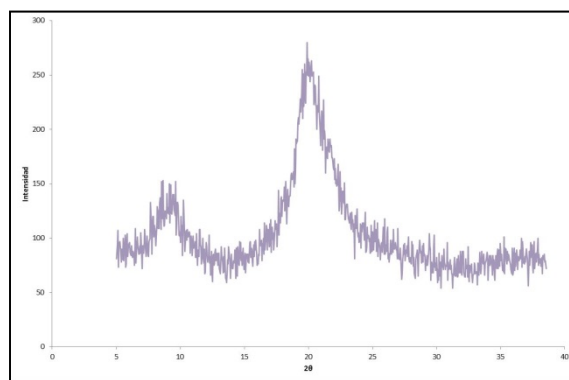
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 10 (Q10)

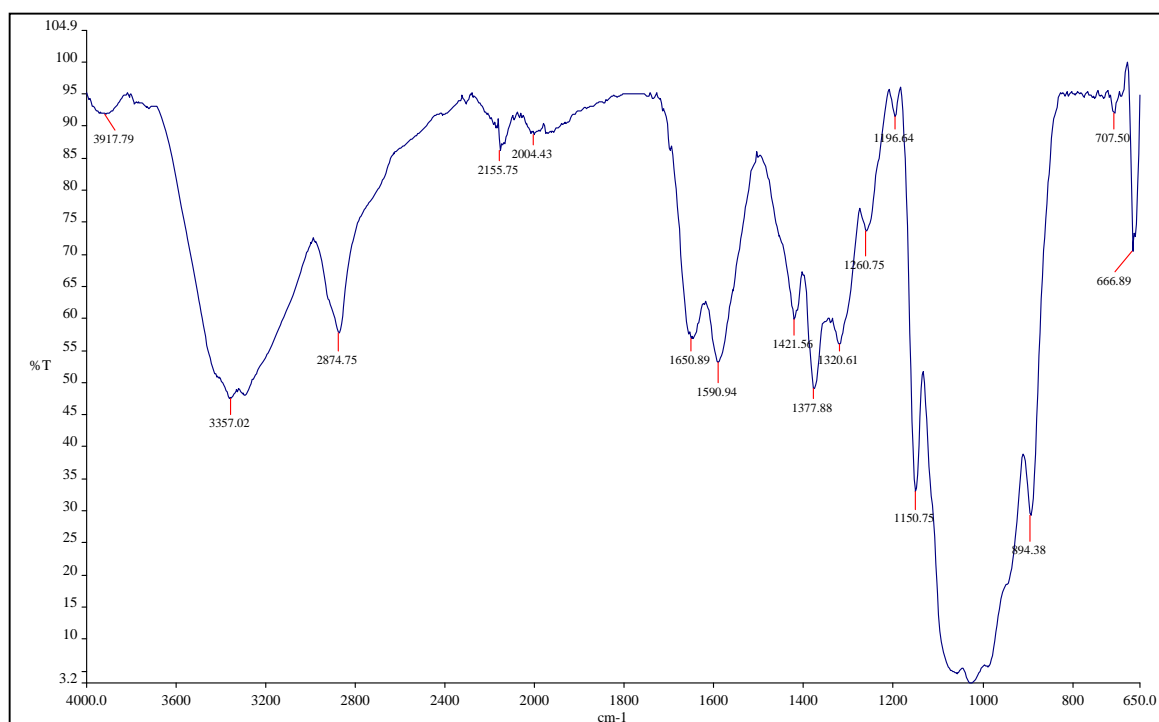
Q85/4000/A1



Espectro de ^1H NMR



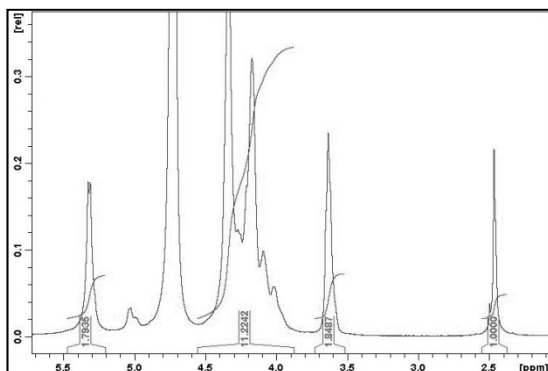
Difractograma de rayos X



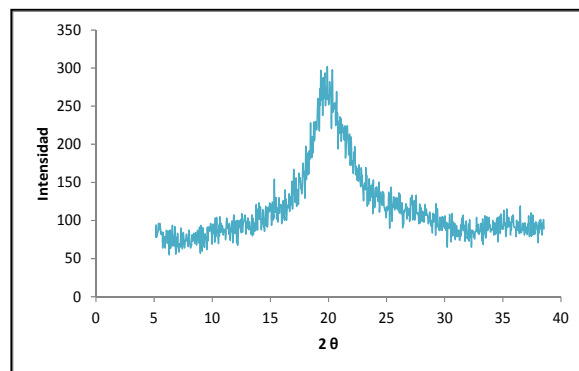
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 11 (Q11)

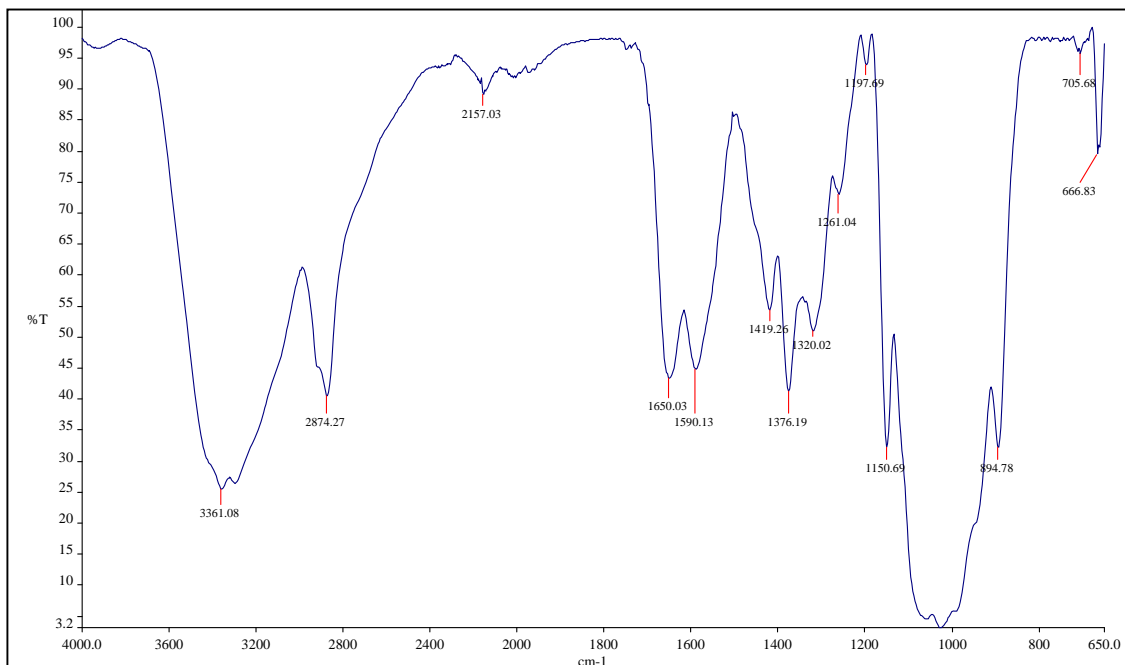
Q85 High Bulk
(Primex)



Espectro de ¹H NMR



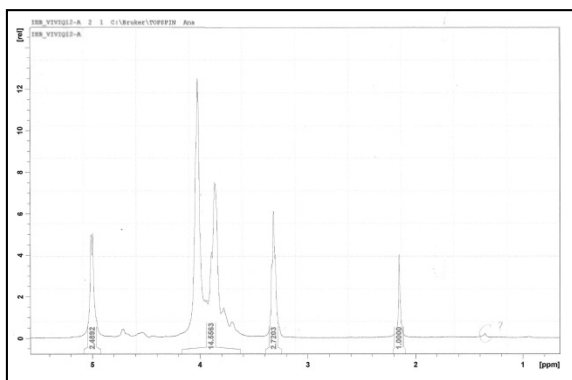
Difractograma de rayos X



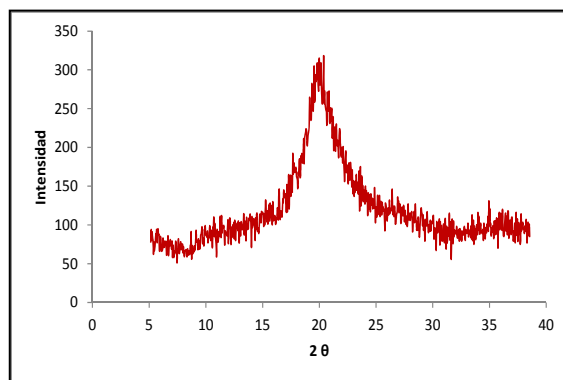
Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)

QUITOSANO 12 (Q12)

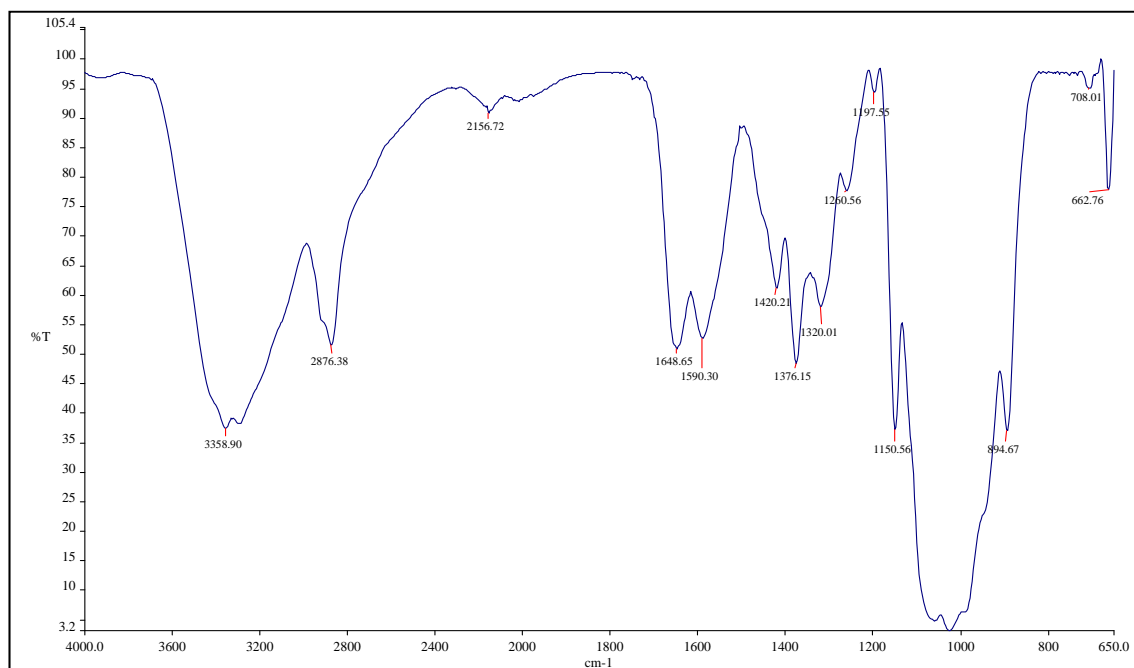
Q95 Farmaceutico
(Primex)



Espectro de ¹H NMR



Difractograma de rayos X



Espectroscopia Infrarroja FT-IR (ATR)