

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INCORPORACIÓN DE EXTRACTO DE *ALOE VERA* EN
NANOPARTÍCULAS PARA ESTIMULACIÓN DE
OSTEOBLASTOS

Por

GERARDO DANIEL SIERRA GARCÍA

Como requisito para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

MAYO 2018

INCORPORACIÓN DE EXTRACTO DE *ALOE VERA* EN
NANOPARTÍCULAS PARA ESTIMULACIÓN DE
OSTEOBLASTOS
Comité de tesis

Presidente: Dr. Abelardo Chávez Montes.

Secretario: Dra. María Julia Verde Star

Vocal 1: Dr. Eduardo Sánchez García

Vocal 2: Dra. Azucena del Carmen González Horta.

Vocal 3: Dra. Adriana Núñez González

INCORPORACIÓN DE EXTRACTO DE *ALOE VERA* EN
NANOPARTÍCULAS PARA ESTIMULACIÓN DE
OSTEOBLASTOS

DIRECTOR DE TESIS: DR ABELARDO CHÁVEZ
MONTES

DIRECTOR EXTERNO: DR. JORGE LARA ARIAS

ASESOR EXTERNO: DR. IVAN ALEJANDRO MARINO
MARTÍNEZ

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Nanotecnología del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Abelardo Chávez y en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Iván Alejandro Marino Martínez y el Dr. Jorge Lara Arias

Vo.Bo

DR. ABELARDO CHÁVEZ MONTES

Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Abelardo Chávez Montes, Jorge Lara Arias e Iván Alejandro Marino Martínez, por permitirme realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, y más allá de eso, por su apoyo y amistad para realizar dicho trabajo.

A la Dra. Azucena González Horta y la Dra. Adriana Núñez González, por sus valiosos consejos y amistad.

A mis compañeros y amigos de trabajo en quienes recibí un apoyo desinteresado y sincero, David Hernández Marín, Aria Barrera, Exiquio Maldonado, Juan Bárcenas, Miguel Castañón, Marlene Silva, Jairo Alvarez, Brenda Arméandariz y Lorena Lugo. Gracias.

A mi familia, mi esposa Diana y mi hijo Gerardo Daniel, por estar conmigo en todo momento, y mis padres y hermanos por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Mexicano de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo brindado a través de la beca al CVU # 351210

A la Facultad de Ciencias Biológicas y el Centro de Investigación y desarrollo en Ciencias de la salud por facilitar sus instalaciones.

A Banco de Hueso del Hospital Universitario por facilitarnos material biológico para realizar la investigación.

DEDICATORIA

A mi esposa Diana Alvarez Pineda, por estar a mi lado en todo momento y no dejarme caer en la desesperación y permitirme crecer en la superación personal.

A mi hijo, Gerardo Daniel, por llegar a mi vida en el mejor momento y ser una motivación para terminar el trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras

Lista de tablas

Resumen

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Aloinjertos de hueso	5
2.2 <i>Aloe vera</i>	6
2.3 Actividades biológicas de <i>Aloe vera</i>	8
2.3.1 Evaluación en quemaduras e incisiones	8
2.3.2 Evaluación con compuestos irritantes que producen edema	9
2.3.3 Reparación de heridas	9
2.4 Nanopartículas poliméricas	11
2.4.1 Formulación de nanopartículas	14
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	18
5.1 Objetivo General	18
5.2 Objetivos particulares	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1 Aislamiento extracto de <i>Aloe vera</i>	19
6.2 Caracterización parcial del extracto	21
6.2.1 Perfil de Carbohidratos:	21
6.3 Preparación de nanocápsulas	22
6.4 Estandarización de la técnica para preparar nanopartículas biodegradables.....	22
6.5 Porcentaje de carga de extracto en nanopartículas.....	23
6.6 Estudios de liberación	23
6.7 Carga de nanopartículas a hueso.....	24
6.8 Microscopía electrónica de barrido.....	24
6.9 Aislamiento y cultivo de células ectomesenquimáticas de médula ósea	24
6.10 Citometría de flujo.	27
6.11 Ensayos de diferenciación osteogénica <i>in vitro</i>	28
6.11.1Análisis histológico.....	28
6.11.2Análisis de la expresión de mRNA.	28
6.12 Estudios <i>in vivo</i>	29
6.13 Análisis estadístico.....	31
7. RESULTADOS	32

7.1 Obtención y caracterización del extracto de <i>Aloe vera</i>	32
7.2 Formulación de nanopartículas incorporadas con polvo de <i>Aloe vera</i>	33
7.2.1 Cuantificación del porcentaje de encapsulación en nanopartículas.	37
7.2.2 Estudio de liberación.....	38
7.2.3 Incorporación de nanopartículas a hueso	39
7.3 Estudios <i>In Vitro</i> e <i>In vivo</i>	40
7.3.1 Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales y citometría de flujo	40
7.3.2 Diferenciación osteogénica	40
7.3.3 Análisis de expresión de mRNA	43
7.3.4 Evaluaciones <i>In vivo</i>	44
8. DISCUSION	46
9. CONCLUSIONES.....	52
10. PERSPECTIVAS	53
11. REFERENCIAS.....	54
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	61
Nombres y firmas del comité de tesis	62
12. ANEXOS.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Componentes del gel de <i>Aloe vera</i>	7
Tabla 2.	Efectos terapéuticos de extracto de <i>aloe vera</i>	11
Tabla 3	Polímeros naturales y sintéticos usados en nanotecnología.....	13
Tabla 4	Formulación inicial de nanopartículas poliméricas biodegradables con extracto de <i>aloe vera</i> incorporado	22

LISTA DE FIGURAS

Fig 1	Planta de <i>Aloe vera</i>	7
Fig 2	Fórmula del PLGA.....	14
Fig 3 y 4	Hojas de <i>Aloe vera</i> para obtención de gel.....	19
Fig 5 y 6.	Obtención de precipitado al disolver gel de <i>Aloe vera</i> en alcohol absoluto.....	20
Fig 7.	Obtención de tejido adiposo mediante lipectomía.....	25
Fig 8 y 9.	Disgregación mecánica de tejido adiposo para posteriormente realizar una disgregación enzimática con colagenasa tipo I a temperatura y agitación controladas.....	25
Fig. 10 y 11.	Separación del precipitado y transferencia de células a tubos falcon del 50 mililitros.....	26
Fig 12.	Células mesenquimales adheridas a la caja de cultivo.....	26
Fig. 13.	Cajas de 2x3 para cultivo de Células con Distintos medios de cultivo para realizar análisis de expresión y tinciones histológicas.....	27
Fig.14	Defecto óseo generado en tibia de conejo.....	29

Fig. 15	Hueso liofilizado para ser injertado en defecto óseo de la tibia de conejo.....	29
Fig 16	Cromatograma de extracto de gel de Aloe vera. Determinación de carbohidratos por hidrólisis ácida mediante HPLC-IR. L.....	31
Fig 17.	Tamaño de nanopartículas con una proporción de 1:1.5 de tensoactivo.....	32
Fig. 18	Tamaño de nanopartículas con una proporción 1:0.5 de e tensoactivo. Nótese una disminución en tamaño y PDI.....	33
Fig. 19	Tamaño promedio de nanopartículas con una proporción de 1:1 de polímero/tensoactivo evaluado mediante la técnica de espectroscopia de correlación fotónica.....	34
Fig.20	Micrografía por microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas poliméricas de PLGA incorporadas con extracto de aloe vera.....	35
Fig. 21	Micrografía por microscopia electrónica de barrido de la formulación de nanopartículas poliméricas evaluando el tamaño.....	35

Fig. 22	Curva de calibración para cuantificación del porcentaje de encapsulación y liberación.....	36
Fig 23	Cinética de liberación del activo a partir de nanopartículas de PLGA en distintos períodos de tiempo a pH 7 y 37°C.....	37
Fig 24.	Fotomicrografía vista al microscopio electrónico de barrido (SEM) a 100x en el cual se observa una espícula de hueso pulverizado liofilizado al que le han sido incorporadas nanopartículas poliméricas.....	38
Fig. 25	Fotomicrografía vista al microscopio electrónico de barrido (SEM) a 15000x donde se observa la superficie de una espícula de hueso pulverizado liofilizado.....	38
Fig. 26	Células mesenquimales indiferenciadas adheridas a la placa de cultivo.....	39
Fig. 27 y 28	Células mesenquimales inducidas a diferenciación con medio osteogénico a los 8 y 16 días teñidas con la tinción Von Kossa. Nótese la presencia de nódulos mineralizados con un color más oscuro.....	40

Fig. 29 y 30	Células mesenquimales inducidas a diferenciación con medio incorporado con aloe vera a los 8 y 16 días teñidas con la tinción Von Kossa.....	41
Fig 31	Expresión del gen de colágeno tipo 1 de acuerdo al tratamiento al que fueron sometidas las células a los 8 días.....	42
Fig 32	Corte histológico teñido con HyE de un defecto realizado en la tibia de un conejo rellenado con aloinjerto de hueso sin nanopartículas con extracto de <i>Aloe vera</i> , en la cual se observa una fibrosis incipiente y restos de trabéculas sin presencia de osteocitos u osteoblastos.....	43
Fig 33	Corte histológico de tibia de conejo, teñido con la técnica de tricrómico de Masson, en el cual les fue realizado un defecto óseo y rellenado con hueso liofilizado con nanopartículas con extracto de <i>Aloe vera</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Factor de crecimiento transformante beta	TGF-B
Proteínas morfogénicas óseas	BMPs
Aloe vera	AV
Factor de crecimiento similar a la insulina	IGF
Factor de crecimiento de fibroblastos	FGF
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF
Factor de crecimiento endotelial vascular	VEGF
Células madre mesenquimales	MSC
Injerto óseo desmineralizado seco congelado	FDDBA
Injerto óseo no desmineralizado seco congelado	DFDBA
Factor de crecimiento de queratinocitos	KGF-1
Poli (ácido láctico)	PLA
poli (ácido glicólico)	PGA
Poli(lactide-co-glicolido)	PLGA
Dulbeco's Modified Eagle Medium	DMEM
Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	GAPDH
Cromatografía líquida de alta eficacia	HPLC
Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa	RT-PCR

RESUMEN

El potencial de productos naturales para inducir la diferenciación de células mesenquimales hacia células osteoprogenitoras no ha sido evaluado. *Aloe vera* ha probado tener la capacidad de reparar o regenerar tejidos blandos y duros. El propósito de éste estudio es el de evaluar la capacidad del extracto de *Aloe vera* como un activo capaz de diferenciar células mesenquimales hacia osteoprogenitoras *In vitro* e *In vivo* para poder ser utilizado como un elemento capaz de inducir regeneración ósea. Material y métodos. Células mesenquimales derivadas de tejido adiposo de ovino fueron aisladas y sometidas a tratamientos para inducir diferenciación a linaje osteogénico. Las células fueron caracterizadas por citometría de flujo y criopreservadas. Para inducir diferenciación osteogénica, las células fueron cultivadas en medio convencional, osteogénico y enriquecido con *Aloe vera* por 8 días. Se evaluó la expresión de colágeno tipo 1 mediante tinciones y reacción en cadena polimerasa (PCR) en tiempo real. Se prepararon lotes de nanopartículas poliméricas incorporando proteína y se caracterizaron mediante tamaño y morfología, así como porcentaje de encapsulación a través de la implementación de una técnica analítica espectroscópica y por microscopía electrónica de barrido. Lotes de nanopartículas fueron incorporados a hueso liofilizado pulverizado para realizar primeros ensayos *In vivo*. Para pruebas *In vivo* a 2 conejos macho de 3 kg les fue generado un defecto óseo en la tibia el cual fue rellenado con hueso liofilizado incorporado con nanopartículas con extracto de *Aloe vera*. Resultados. Se obtuvo un extracto a partir del gel extraído de la hoja de *Aloe vera* que se caracterizó por perfil de carbohidratos. Los ensayos *in vitro* demostraron la presencia de colágeno tipo 1, indicativo de diferenciación osteogénica. Se obtuvieron y aislaron los extractos de *Aloe vera* los cuales se incorporaron a nanopartículas poliméricas con un diámetro promedio de 150 nm mediante la técnica de doble emulsión- evaporación de solvente. En los cortes histológicos se observó una diferencia significativa entre la neoformación ósea entre el grupo en el cual fue incorporado hueso liofilizado con nanopartículas de extracto de *Aloe vera* y el grupo control. Conclusión. Estos resultados sugieren que la efectividad de la formulación de extracto de *Aloe vera* encapsulado en nanopartículas poliméricas biodegradables incorporadas sobre hueso promueve la actividad osteogénica y con ello la reparación más acelerada del defecto.

ABSTRACT

The potential of natural products to induce the differentiation of mesenchymal cells into osteoprogenitor cells has not been evaluated. Aloe vera has proven to have the ability to repair or regenerate soft and hard tissues. The purpose of this study is to evaluate the capacity of the extract of Aloe vera as an active able to differentiate mesenchymal cells towards osteoprogenitors In vitro and In vivo to be used as an element capable of inducing bone regeneration. Material and methods . Mesenchymal cells derived from ovine adipose tissue were isolated and subjected to treatments to induce differentiation to osteogenic lineage. The cells were characterized by flow cytometry and cryopreserved. To induce osteogenic differentiation, the cells were cultured in conventional, osteogenic medium and enriched with Aloe vera for 8 days. The expression of type 1 collagen was assessed by staining and polymerase chain reaction (PCR) in real time. Batches of polymeric nanoparticles incorporating protein were prepared and characterized by size and morphology, as well as percentage of encapsulation through the implementation of an analytical spectroscopic technique and by scanning electron microscopy. Lots of nanoparticles were incorporated into pulverized lyophilized bone to perform first in vivo assays. For in vivo tests to 2 male rabbits of 3 kg were generated a bone defect in the tibia which was filled with lyophilized bone incorporated with nanoparticles with Aloe vera extract. Results An extract was obtained from the gel extracted from the Aloe vera leaf, which was characterized by a carbohydrate profile. The in vitro tests demonstrated the presence of type 1 collagen, indicative of osteogenic differentiation. Aloe vera extracts were obtained and isolated and incorporated into polymeric nanoparticles with an average diameter of 150 nm using the double emulsion-solvent evaporation technique. In the histological sections, a significant difference was observed between bone neoformation between the group in which lyophilized bone was incorporated with Aloe vera extract nanoparticles and the control group. Conclusion. These results suggest that the effectiveness of the formulation of Aloe vera extract encapsulated in biodegradable polymer nanoparticles incorporated on bone promotes osteogenic activity and with it the more accelerated repair of the defect.

1. INTRODUCCIÓN

El hueso se puede reparar por si solo pero ha sido establecido que este hecho no siempre resulta totalmente satisfactorio. Especialmente en caso de grandes defectos donde es necesario colocar un material de relleno que posteriormente será reemplazado por tejido nuevo (Pinar *et al*, 2010).

El relleno óseo ideal debe satisfacer los requerimientos esenciales, como ser osteoconductor, imitar la porosidad y microestructura del tejido natural, y tener la capacidad de albergar células osteogénicas y factores de crecimiento. De todos los sustitutos óseos usados actualmente en la clínica, el que presenta las mejores propiedades es el autoinjerto. Sin embargo, debido a la morbilidad del sitio donante, riesgo de infección, etc. la búsqueda de terapias alternativas continúa. Una alternativa a los autoinjertos es la liberación de factores de crecimiento liberados *in situ*. Específicamente, en sustitutos óseos fabricados mediante ingeniería de tejidos consistentes en células formadoras de hueso, en andamios con porosidades que funcionan como un microambiente, y factores de crecimiento que guían y proliferan la diferenciación de las células. Durante la regeneración ósea, se ha demostrado que varios de factores de crecimiento están implicados, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF-B) y las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), las cuales se ha probado incluso, son capaces de inducir la diferenciación de células ectomesenquimáticas indiferenciadas a osteoblastos para favorecer una regeneración ósea (Pinar *et al*, 2010).

Actualmente existen estudios de generación de andamios de diferentes materiales como minerales, hueso en polvo o polímeros biodegradables que intentan formar un microambiente celular que sean estimuladas por proteínas para promover una regeneración ósea. (Pinar *et al*, 2010) Las ciencias fitoquímicas y fitofarmacológicas han establecido la composición y la actividad biológica de muchos productos naturales. La mayoría de los constituyentes biológicamente activos de los extractos, como los flavonoides, taninos y terpenoides son altamente solubles en agua, sin embargo exhiben una pobre absorción puesto que son incapaces de cruzar la membrana celular, resultando en una pobre absorción y una pérdida de la biodisponibilidad y eficacia (Bonifacio et al 2014).

Entre los productos naturales como agentes terapéuticos, las proteínas destacan por su difícil administración ya que presentan tiempos de vida media muy bajos en el organismo por degradación química, principalmente por proteasas, además por ser moléculas grandes son sensibles a degradación por la gran presencia de grupos funcionales presentes en su estructura, la cual, también es muy sensible ya que se estabiliza mediante uniones físicas relativamente débiles que pueden alterarse con facilidad y de manera irreversible y finalmente, las proteínas tienen baja capacidad de penetración a través de los epitelios, salvo que existan moléculas o sistemas transportadores adecuados (Park et al 2009).

En los últimos años, la inclusión de las plantas medicinales en medicina alternativa ha ido en aumento en nuestra sociedad como una forma de mejorar la calidad de vida de las personas. Este interés surge de las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas, que son útiles en la curación de diversas enfermedades con la ventaja de ser 100% natural (Silva et al 2013).

Un buen ejemplo es el uso de *Aloe vera* (AV), una planta tropical que pertenece a la familia *Liliaceae*, como un acelerador de la cicatrización de pequeñas heridas y quemaduras debido a su efecto antimicrobiano y la acción epitelizante sobre la piel dañada. El gel extraído de la hoja de AV también se ha utilizado como un agente de curación en los productos cosméticos y los medicamentos. Los beneficios para la salud asociado con AV se han atribuido a su composición, heterogeneidad, que contenido de aminoácidos, enzimas, vitaminas, polisacáridos (pectinas, celulosa, hemicelulosa, glucomanano, extracto de *Aloe vera* y derivados de manosa) y otras sustancias de bajo peso molecular (Silva et al 2013).

La estrategia de utilizar nanotecnología a los extractos naturales ha sido ampliamente citada en la literatura, debido a que sistemas nanoestructurados pueden potenciar la acción de los productos naturales, promover una liberación sostenida, reducir la dosis, disminuir los efectos secundarios y mejorar la biodisponibilidad. Aunque las contribuciones de la nanotecnología han sido ventajosas para muchas áreas, es importante resaltar algunas desventajas. Investigadores han resaltado un elevado precio, dificultad de escalar el proceso a mayor alcance, y la fácil incapacitación de las nanopartículas, pudiendo ocasionar enfermedades en pulmón u otras enfermedades que lleven a un cambio en la homeostasis (Bonifacio et al 2014).

2. ANTECEDENTES

Existen tres mecanismos relacionados con el éxito en la regeneración ósea, estos mecanismos son la osteogénesis, la osteoinducción y la osteoconducción. Todos los materiales que se utilizan poseen al menos uno de estos tres mecanismos de acción.

Osteogénesis es el proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo. Los materiales osteogénicos se derivan o se encuentran formados por tejido implicado en crecimiento y reparación, por ejemplo el hueso autólogo, es decir, del mismo paciente (Jensen 2006).

Osteoinducción describe el proceso en el cual nuevo hueso es producido en una región no ósea. Esto se logra gracias a los materiales osteoinductores que estimulan la diferenciación de células osteogénicas de células hemopoyéticas o mesenquimáticas. Son ejemplo de materiales osteoinductivos: el hueso autólogo en la fase de reabsorción que libera proteínas morfogenéticas, plasma rico en factores de crecimiento, las proteínas morfogenéticas (Jensen 2006).

Osteoconducción, describe la formación de hueso por el proceso de crecimiento interno de capilares y células osteoprogenitoras del lecho receptor dentro y alrededor de un injerto o implante.

El injerto o implante actúa como una matriz para la formación de nuevo hueso. A diferencia de la osteoinducción, este proceso ocurre en un ambiente en donde ya existe hueso. Son ejemplos de materiales osteoconductores: hueso autólogo, fibrina autóloga, hidroxiapatita reabsorbible, sulfato de calcio, fosfato tricálcico, fibrina liofilizada, hueso desmineralizado, cristales cerámicos bioactivos y otros (Jensen 2006).

Durante la regeneración ósea, una variedad de factores de crecimiento incluyendo factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) la superfamilia de proteínas (proteínas morfogenéticas óseas, especialmente, BMP), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento endotelial

vascular (VEGF) funcionan con un tiempo complejo y patrón de concentración. Entre estos las BMP pueden inducir la formación de hueso mediante la inducción de las células madre mesenquimales (MSC) hacia la diferenciación osteoblástica y son los factores de crecimiento osteogénicos actualmente más descritos (Pinar *et al*, 2010).

En algunos estudios se combinaron BMPs con otros factores de crecimiento para lograr una mejor reparación. Por ejemplo, BMP-2 y TGF- β 3 se combinaron y su entrega llevó a una mejor formación de hueso in vivo, mientras que el efecto de un solo factor de crecimiento fue insignificante. También han sido reportados los efectos positivos de VEGF en combinación con BMP-2 en la regeneración ósea in vivo, y el IGF-1 encapsulado en forma conjunta con micropartículas con BMP-2 y luego cargados en andamios porosos en la regeneración periodontal in vitro (Pinar *et al*, 2010).

BMP-7 ha mostrado buen acople con BMP-2 en la inducción de morfogénesis ósea y ambos fueron aprobados para su uso por la FDA en aplicaciones clínicas. Por lo tanto, se consideró que el desarrollo de los andamios que podría suministrar una combinación de BMP-2 con BMP-7 de una manera dependiente del tiempo es una opción viable hacia la curación ósea (Pinar *et al*, 2010).

La evolución constante de la medicina ha motivado el surgimiento de tecnologías que permitan mejorar los resultados obtenidos en el tratamiento de los pacientes. Si bien el enfoque inicial consistía en preservar la vida y limitar el daño ocasionado por los agentes patógenos, la medicina actual exige además la optimización de la calidad de vida evitando al máximo las complicaciones atribuibles a los tratamientos, además de minimizar el uso de procedimientos de mutilación como las amputaciones (López-Martínez *et al* 2012).

La cirugía general no ha estado al margen de esta situación y una de las tecnologías más importantes de los últimos cincuenta años ha sido el desarrollo de bancos de huesos y tejidos cuyo impacto es tal que una gran cantidad de las cirugías que se realizan hoy en día son posibles gracias a la disponibilidad de aloinjertos óseos y tendinosos (López-Martínez *et al* 2012).

Los aloinjertos óseos son aquellos materiales procedentes de un individuo de la misma especie que se utilizan para promover una respuesta basada en alguna de las propiedades osteogénicas, osteoinductora y osteoconductoras que caracterizan al tejido óseo, reuniendo las características idóneas para la reconstrucción de los defectos óseos, frente a otros sustitutos biológicos o sintéticos (López-Martínez et al 2012).

2.1 Aloinjertos de hueso

Es el biomaterial disponible a partir de un donador de la misma especie pero diferentes genéticamente. Por otro lado el aloinjerto pueden aislarse o someterse a un procesamiento para combinarlo con hueso autógeno mediante técnicas de liofilización, ahora bien si se le adiciona materiales osteoconductores al hueso autólogo se puede expandir el volumen, inducir la formación densa de hueso nuevo y prevenir la reabsorción temprana. Los aloinjertos vienen a hacer el sustituto óseo más frecuentemente elegido.

.Ejemplos:

1. Injerto óseo desmineralizado seco congelado (FDBA).- es el más utilizado por ser osteoconductor
2. Injerto óseo no desmineralizado seco congelado (DFDBA) induce a las células mesenquimales no diferenciadas a transformarse en osteoblastos.

Las partículas de hueso deberán ser cuidadosamente tratadas por ser muy pequeñas de 24 a 800 micrómetros, además son las que presentan gran poder osteoinductivo y osteoconductor. El hueso cortical es el empleado en esta técnica obtenido de un donador posterior a 12 horas de fallecido, el hueso es tratado quitándole la grasa, se corta en piezas de tamaño variable, se lava con alcohol y se congela para posteriormente desmineralizarlo, cortarlo a un tamaño de 250-750 μm , congelarlo en seco y llevarlo al vacío (Groover et al 2011).

Los aloinjertos también han sido empleados exitosamente por muchos años por varios clínicos por una variedad de situaciones. Los aloinjertos ofrecen los medios para reparar y aumentar el hueso perdido y muchas aplicaciones sin la necesidad de cosechar hueso autógeno de un segundo sitio. El uso de hueso de cadáver para

injertos está prohibido en gran parte del mundo a pesar de que en 25 años que este material ha sido usado no ha habido incidentes de transmisión de enfermedades reportadas a la fecha (Aghaloo et al 2005).

El hueso congelado desecado mineralizado y no mineralizado es obtenido por medio de cadáveres, esterilizado, liofilizado o congelado desecado, y almacenado en un banco de tejidos. El hueso congelado desecado puede ser mineralizado o desmineralizado. El proceso de desmineralización expone la colágena y factores de crecimiento, incluyendo a las proteínas morfogenéticas de hueso y puede activarlas. El hueso congelado desecado, especialmente el de tipo desmineralizado puede estimular formación ósea a través de la osteoinducción (Aghaloo et al 2005).

Las ventajas de los aloinjertos sobre los autoinjertos están en relación a su más fácil disponibilidad, ausencia de morbilidad de la zona dadora, menor tiempo quirúrgico y menor sangrado, capacidad de reconstrucción grandes defectos, etc. Entre sus desventajas están los tiempos de incorporación más prolongados y la capacidad osteoconductiva y osteoinductiva menores comparada con el autoinjerto (Gil Albarova et al 2001).

Debido a su tiempo de incorporación más prolongado, se hace necesario encontrar medios que promuevan que el aloinjerto tenga una mejor capacidad osteoconductiva y osteoinductiva (Gil Albarova et al 2001). Gracias a los pobres resultados que muestra la administración parenteral sistémica de los factores de crecimiento para regeneración ósea ésta ha sido descartada. Diversos estudios han demostrado que extracto de *Aloe vera*, un carbohidrato aislado de *Aloe vera* presenta buenas propiedades como la estimulación de liberación de factores de crecimiento.

2.2 *Aloe vera*

Aloe vera es una planta suculenta de la subfamilia Asphodeloideae dentro de la familia Xanthorrhoeaceae. Pertenece a la familia de las liláceas, de las cuales existen alrededor de 360 especies. En promedio mide aproximadamente 30 cm. Es una planta similar al cactus que crece rápidamente en climas cálidos y secos. En la figura 1 se observa macroscópicamente un ejemplar de la planta. Cosméticos y productos

medicinales son hechos de la sustancia mucilaginosa contenida en el centro de la hoja de *Aloe vera* y recibe el nombre de gel de *Aloe vera*. Las acciones farmacológicas de *Aloe vera*, estudiadas *in vitro* o en animales incluyen actividad antiinflamatoria y anti artrítica, y efectos antibacteriales e hipoglicémicos. *Aloe vera* contiene cerca de 75 elementos potencialmente activos: vitaminas, enzimas, minerales, carbohidratos, ácidos salicílicos, aminoácidos entre otros. (Vogler, Ernst 1999) En la tabla 1 se enumeran algunos de los componentes presentes en el gel *Aloe vera*.



Fig 1. Plantas de *aloe vera*

Antraquinonas: Aloina Barbaloina Isobarbaloina Emoína	Compuestos inorgánicos Calcio Sodio Magnesio Hierro	Carbohidratos Celulosa Glucosa Manosa Aldopentosa Acemanano Glucomanano
Aminoácidos Lisina Valina Isoleucina Metionina	Vitaminas B1 B2 B6 C	Enzimas Oxidasa Catalasa Lipasa Fosfatasa Alcalina

Tabla 1. Principales componentes del gel de *Aloe vera*

Una de los mayores componentes presentes en el gel de *Aloe vera* es el polisacárido acemanano. Este polisacárido es un polímero de cadena larga unida por unidades de manosa acetilada, mantenidas mediante enlaces beta 1-4. Además se encuentran

presentes monómeros de glucosa y galactosa. Este polisacárido ha sido investigado y ha demostrado efectos terapéuticos tales como la inmunoestimulación, antineoplásico y reparación de heridas.

2.3 Actividades biológicas de *Aloe vera*.

Aloe vera se ha utilizado terapéuticamente, sin duda desde la época romana y tal vez mucho antes. Diferentes propiedades se le atribuyen al gel interior, incoloro, y al exudado de las capas exteriores. Ahora hay menos dudas en cuanto a la eficacia del material, aunque hay algunas advertencias de efectos secundarios o reacciones alérgicas. Reacciones nocivas por el tratamiento de gel de aloe se registran con poca frecuencia. Las razones presentadas para la eficacia del gel aloe todavía son variadas tal vez porque existen varios mecanismos de reparación que participan en el proceso. Los polisacáridos son un grupo de componentes del gel para los cuales se ha atribuido actividad en especial en las reacciones de inmunomoduladores y uno, acemanano, ha alcanzado el estatus de propiedad (Reynolds, Dweck 1999).

2.3.1 Evaluación en quemaduras e incisiones

Para probar la eficacia de gel de aloe o de sus diferentes componentes en la inflamación se han utilizado una serie de pruebas, por lo general en relación con algún tipo de herida deliberada. Éstos deben distinguirse de los ensayos clínicos en los que ya existen las lesiones y se tratan más o menos sistemáticamente por un número de agentes terapéuticos.

Un estudio evaluó la influencia de la administración oral de *Aloe vera* en reparación de heridas cutáneas en ratas radiadas y busco correlacionar el resultado de reparación con la expresión de niveles de los factores de crecimiento transformante beta y factor de crecimiento de fibroblastos en la herida. Se pudo concluir que la administración oral de *Aloe vera* demostró una mejora significativa en la reparación de heridas después de una exposición sencilla a radiación. La mayor actividad puede ser atribuida a su efecto estimulante en las células inflamatorias, proliferación de fibroblastos, angiogénesis y producción de factores de crecimiento (Atiba et al 2011).

Previos estudios *in vivo* demostraron que extracto de acemanano promueve la reparación de heridas e induce la formación de dentina de reparación. Boonyagul et al investigaron los efectos de acemannan en la proliferación de MSC y secreción de matriz extracelular *in vitro* y el efecto de extracto de *Aloe vera* en la reparación de un alveolo dental de rata post extracción. Se realizó extracción a los incisivos inferiores y se dividieron en 4 grupos, grupo I fue el control, grupos II, III, y IV les fue colocada esponjas de extracto de *Aloe vera* de 8, 16 y 32 mg/kg respectivamente. Se obtuvieron resultados que demostraron que acemanano estimuló significativamente la proliferación de MSCs, actividad de fosfatasa alcalina, expresión de factor de crecimiento vascular endotelial, proteína morfogenética ósea 2, osteopontina, y mineralización. Los resultados de los estudios *in vitro* demostraron que los grupos tratados con acemanano presentaban una mayor densidad ósea y una reparación más rápida comparado con los que no recibieron. Estos datos sugieren que acemanano puede actuar como una molécula bioactiva que induce la formación de hueso por la estimulación de MSCs, diferenciación a osteoblastos y síntesis de matriz extracelular.

2.3.2 Evaluación con compuestos irritantes que producen edema

Se han llevado a cabo estudios en los que se induce inflamación, causada por la acumulación de líquido en un tejido (edema) iniciada por compuestos irritantes. Se ha usado como un modelo animal de inflamación la oreja de ratón o de rata o la pata trasera como sujetos. Aceite de Croton, un potente irritante, se aplicó a la oreja derecha con la izquierda restante como control. La inflamación se midió pesando una muestra de tejido y se demostró que disminuye después de la aplicación tópica de gel de aloe (Davis et al 1987).

2.3.3 Reparación de heridas

La reparación de heridas es un complejo proceso que involucra distintos tipos celulares para la migración, proliferación, diferenciación y remoción del tejido dañado, y formación de matriz extracelular. Los fibroblastos secretan factores de crecimiento y matriz extracelular como el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF-1), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y colágeno tipo I para

producir nuevo tejido. *Aloe vera* ha sido usado como una medicina natural para la reparación de quemaduras (Jettanacheawchankit et al 2009). Por otro lado se observó un aumento en la velocidad de la reparación de lesiones en un estudio detallado de los principios de la curación de una incisión quirúrgica. Los objetivos de este estudio fueron investigar los efectos de extracto de *Aloe vera* en la proliferación de fibroblastos gingivales, expresión de KGF-1, VEGF y colágeno tipo I, y reparación de una lesión en ratas. 60 ratas fueron usadas para evaluar el efecto de extracto de *Aloe vera* en reparación de heridas orales. Los animales fueron anestesiados, y les fue realizada una lesión de 4 mm en el paladar duro. Los animales fueron divididos equitativamente en 6 grupos. En el grupo I los animales fueron tratados tópicamente con solución salina como control negativo. Grupo II fueron tratados con triamcinolona. Grupo III fueron tratados con el adhesivo carbopol. Grupos IV, V y VI fueron tratados con carbopol conteniendo 0.5%, 1% y 2% de acemanano. A los días 3 y 7, 5 animales de cada grupo fueron sacrificados y las lesiones fueron medidas y se realizó técnica histológica. Los resultados sugieren que extracto de *Aloe vera* induce significativamente la proliferación de fibroblastos gingivales. El acemanano a 16mg/ml, la máxima concentración usada en este estudio no fue toxica para los fibroblastos. Los efectos de acemanano en la secreción de KGF-1 y VEGF fueron examinados con la prueba de ELISA. Los resultados demuestran que extracto de *Aloe vera* estimula la síntesis de estos factores de crecimiento por los fibroblastos. También se comprobó que acemanano estimula la síntesis de colágeno tipo I. Los datos también sugieren que Carbopol con 0.5% de acemanano reducen significativamente el tamaño de la herida en comparación con la triamcinolona. Con esto se demuestra que acemanano acelera la síntesis de matriz extracelular en la reparación de heridas, vía la estimulación de KGF-1 y VEGF y colágeno tipo I por los fibroblastos. (Jettanacheawchankit et al 2009) Algunos de los efectos terapéuticos reconocidos del acemanano se muestran en la tabla 2.

Inhibición de adhesión de microorganismos a células pulmonares	Azghani et al (1995)
Estimulación de la formación de macrófagos	Egger et al (1996)
Ausencia de toxicidad	Fogleman et al (1992)
Estimulación de la producción de leucocitos	Green (1996)
Necrosis de tumores en felinos y caninos	Harris et al (1991)
Supresión de replicación de virus in vitro	Kahlon et al (1991)
Terapia contra SIDA	Kahlon et al (1991)
Estimulación de síntesis de colágeno	Lindblad (1994)
Reparación de úlceras orales	Plemons et al (1994)
Estimulación de fagocitosis	Stuart et al (1997)
Reparación de heridas	Tizard et al (1994)

Tabla 2. Efectos terapéuticos de extracto de *aloe vera*

En la actualidad, se buscan sistemas de andamiaje que contengan y liberen *in situ* proteínas o carbohidratos. Entre los distintos sistemas de liberación destacan las nanopartículas poliméricas. Las nanopartículas poliméricas son sistemas coloidales sólidos con un tamaño de partícula entre 10 y 1000 nm. Durante las últimas décadas, ha existido un enorme interés en el uso de nanopartículas poliméricas como sistema de liberación de moléculas con actividad biológica. Estos sistemas coloidales ofrecen ventajas remarcables, tales como la protección del fármaco contra agentes externos que inducen su degradación, el direccionamiento del principio activo a sitios específicos de acción (órganos, tejidos o células) y la liberación de moléculas biológicas como proteínas, péptidos o carbohidratos.

2.4 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas se pueden definir como objetos que varían en tamaño de 1 a 100 nm que, debido a su tamaño, pueden diferir del material puro. Las nanopartículas están siendo utilizadas para diversos fines, desde tratamientos médicos, también son utilizadas en diversas ramas de la producción industrial, como baterías de

combustible solar y de óxido para almacenamiento de energía. El desarrollo de nanopartículas se ha convertido en un área de investigación importante en el campo de la administración de fármacos, ya que tienen la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por períodos de tiempo sostenido (Llabot et al 2008).

Las nanopartículas poliméricas se preparan a partir de polímeros biocompatibles y biodegradables en tamaño entre 10-1000 nm donde el fármaco se disuelve, queda atrapado, encapsulado o unido a una matriz de nanopartículas. Las nanopartículas basadas en polímeros transportan eficazmente fármacos, proteínas y ADN a las células y órganos diana. Su tamaño nanométrico promueve la penetración efectiva a través de las membranas celulares y la estabilidad en el torrente sanguíneo.

Ventajas de las nanopartículas poliméricas

- Aumenta la estabilidad de cualquier agente farmacéutico volátil,
- Fabricación fácil y barata en grandes cantidades por una multitud de métodos.
- Ofrecen una mejora significativa sobre los métodos de administración oral e intravenosa tradicionales en términos de eficiencia.
- Entrega una mayor concentración de agente farmacéutico a una ubicación deseada.
- La elección del polímero y la capacidad de modificar la liberación del fármaco a partir de nanopartículas poliméricas los han convertido en candidatos ideales para la terapia del cáncer, la administración de vacunas, los anticonceptivos y el suministro de antibióticos específicos.
- Las nanopartículas poliméricas se pueden incorporar fácilmente en otras actividades relacionadas con la administración de fármacos, como la ingeniería de tejidos (Hassan et al 2015).

Los polímeros deben ser compatibles con el cuerpo en términos de adaptabilidad (no toxicidad) y (no antigenicidad) y deben ser biodegradables y biocompatibles. En la tabla 3 se enumeran los principales polímeros naturales y sintéticos utilizados en nanotecnología.

Polímeros naturales	Polímeros sintéticos
Chitosan	Poliláctidos (PLA)
Gelatina	Poliglicolicos (PGA)
Alginato de sodio	Polilactidos glicólicos (PLGA)
Albúmina	Poliacrilamida
	Polietilenglicol
	Policaprolactona

Tabla 3. Polímeros naturales y sintéticos usados en nanotecnología

Los polímeros sintéticos han recibido mayor atención en la encapsulación de fármacos. Los más utilizados son poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros, poli(lactide-co-glicolido) (PLGA). Las propiedades químicas de estos polímeros permiten la degradación hidrolítica a través de la desesterificación. Una vez degradados, los componentes monoméricos de cada polímero se eliminan por vías naturales. El PGA se convierte en metabolitos o se elimina por otros mecanismos, y el PLA se puede eliminar a través del ciclo del ácido tricarboxílico. Debido a estas propiedades, PLA y PGA se han usado en productos y dispositivos biomédicos, como suturas degradables que han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. PGA es un polímero hidrofílico y altamente cristalino con una tasa de degradación relativamente rápida. Aunque estructuralmente es muy similar al PGA, el PLA muestra diferentes propiedades químicas, físicas y mecánicas debido a la presencia de un grupo metilo colgante en el carbono alfa. En general, se prefiere el copolímero PLGA en comparación con sus homopolímeros constituyentes para la fabricación de constructos de sustituto óseo, ya que PLGA ofrece un control superior en comparación con las propiedades de degradación variando la relación entre sus monómeros. PLGA, cuya fórmula se observa en la figura 2, tiene un amplio rango de tasas de degradación, gobernadas por la composición de cadenas, tanto hidrofóbicas / hidrofílicas balance y cristalinidad. Además estos polímeros son conocidos por su biocompatibilidad y por la posibilidad de manipular la tasa de degradación y, en consecuencia, la velocidad de liberación de fármacos, por aumento de hidrofobicidad o un aumento de hidrofiliidad de la nanopartícula (Llabot et al 2008).

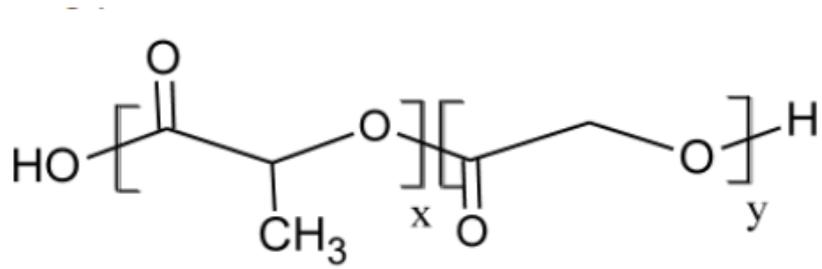


Fig 2.Estructura química del PLGA

Los beneficios obtenidos por el uso de estos polímeros, como acarreadores de principios activos, radican en sus características fisicoquímicas: tamaño nanométrico, gran área superficial, versatilidad en sus propiedades de superficie (hidrofobicidad, carga, incorporación de ligandos biológicamente activos) y variable composición polimérica. Asimismo, la modulación de sus propiedades de superficie permite modificar ciertos fenómenos biológicos que se presentan una vez que las nanopartículas se encuentra en el organismo, como por ejemplo su bioreconocimiento, biodistribución, bioadhesión y absorción celular. Finalmente, al cambiar la composición polimérica de estos vectores, por ejemplo usando materiales biodegradables, las nanopartículas pueden proporcionar una liberación controlada del fármaco encapsulado en el sitio blanco por periodos de días e incluso semanas. (Mohanraj, Chen 2006). Por el momento, los polímeros naturales no disfrutan de la facilidad de diseño de formulación en comparación con los polímeros sintéticos, pero su excelente biocompatibilidad y seguridad los hace muy importantes en la preparación de varios sistemas de administración de fármacos con el potencial de lograr el objetivo del formulador de entrega protegida de agentes bioactivos. Sin embargo, es necesario aumentar los trabajos en un futuro próximo sobre estos polímeros

2.4.1 Formulación de nanopartículas

Existen varios métodos diferentes para la preparación de nanopartículas, como así también numerosas formas de incorporar los fármacos en las partículas. El método más comúnmente utilizado para la preparación de nanopartículas es la emulsificación-evaporación. Consiste en la disolución del polímero y el compuesto en un solvente orgánico (diclorometano o cloruro de metileno). La emulsión se

prepara mediante la adición de agua y un surfactante a la solución de polímeros. En muchos casos, la formación de “nano-gotas” por parte del polímero es inducida por sonicación u homogeneización. El disolvente orgánico luego es evaporado y las nanopartículas son generalmente recolectadas por centrifugación y liofilización (Llabot et al 2008).

El método de doble o múltiple emulsión ha hecho posible encapsular compuestos hidrófilos. Las técnicas mencionadas anteriormente poseen el inconveniente de utilizar solventes tóxicos los que pueden degradar por ejemplo a las proteínas si entran en contacto durante el proceso. En consecuencia, se ha hecho un esfuerzo para desarrollar otras técnicas a fin de aumentar la estabilidad de fármacos durante la preparación (Llabot et al 2008).

Las nanopartículas también pueden ser obtenidas por el método de nano precipitación. Otro método utilizado es el de salting-out que no utiliza disolventes clorados. El método de polimerización interfacial utiliza las ventajas de ciertos polímeros con rápida velocidad de polimerización.

Al considerar el uso de nanopartículas poliméricas para una determinada vía de administración de fármacos, el tamaño de las partículas y la eficiencia de encapsulación son dos de las características más importantes de la formulación. Si el objetivo es la rápida disolución en el organismo o la absorción, entonces el tamaño de las nanopartículas debe ser aproximadamente de 100 nm o menos. Si se requiere disolución prolongada de las partículas deberán ser más grandes en torno a los 800 nm (Llabot et al 2008).

Otra característica de las nanopartículas es el potencial zeta, el cual es una medida de la carga de la partícula, como tal, y cuanto mayor es el valor absoluto del potencial zeta mayor es la cantidad de carga de la superficie. La liberación del fármaco desde las nanopartículas es una de las características más importantes de estos sistemas. Son varios los factores que afectan este parámetro. Las partículas de mayor tamaño tienen una liberación inicial menor que las partículas pequeñas. Además, cuanto mayor es la carga del fármaco es mayor y más rápida la velocidad de liberación. (Llabot et al 2008).

Para desarrollar un sistema de nanopartículas exitoso, tanto la liberación del fármaco como la biodegradación del polímero son factores de consideración importantes. En general, la velocidad de liberación del fármaco depende de: (1) solubilidad del fármaco; (2) difusión del fármaco a través de la matriz de nanopartículas; (4) erosión / degradación de la matriz de nanopartículas; y (5) combinación del proceso de erosión / difusión. Por lo tanto, la solubilidad, difusión y biodegradación de los materiales de la matriz rigen el proceso de liberación.

Los sistemas de nanopartículas tienen un gran potencial, pudiendo convertir sustancias biológicamente activas poco solubles, poco absorbibles y lábiles en fármacos útiles. Para optimizar este sistema de administración de fármacos, aún se requiere una mayor comprensión de los diferentes mecanismos de las interacciones biológicas y la ingeniería de partículas. Se necesitan más avances para cambiar el concepto de nanopartícula

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La reconstrucción de defectos óseos masivos, secuela de grandes traumatismos o provocados por amplias resecciones óseas, continua planteando un verdadero desafío para la medicina. Clásicamente, estos defectos se han intentado reparar con hueso autólogo fresco. A pesar de que el autoinjerto continua siendo un buen recurso biológico, las molestias post operatorias adicionales que supone para el paciente la obtención del injerto hace necesario buscar otras alternativas terapéuticas.

La puesta en marcha de bancos de hueso para la conservación de aloinjertos ha abierto nuevas perspectivas para la reconstrucción de grandes defectos óseos. En el terreno experimental, el aloinjerto de matriz ósea mineralizada o desmineralizada se ha mostrado muy eficaz en la reparación de defectos óseos. Sin embargo, muy poco se conoce sobre el efecto de este tipo de injertos a los que les haya sido incorporados elementos que en la literatura han demostrado un efecto osteogénico como el polisacárido presente en el extracto de *Aloe vera*.

Esta propuesta está basada en la aplicación de la nanotecnología a los sistemas de liberación de fármacos para proporcionar un tratamiento alternativo biodirigido para potenciar el tratamiento de osificación. Específicamente, se elaborarán formulaciones a base de nanopartículas biodegradables, con un tamaño menor a 300 nm, cargadas de forma individual con extracto de gel de parénquima de *Aloe vera* obtenido por precipitación alcohólica. Las formulaciones farmacéuticas estarán destinadas a ser adsorbidas en hueso en polvo cadavérico

4. HIPÓTESIS

Al incorporar al andamio constructo multifuncional desarrollado a partir de hueso cadavérico con extracto de *Aloe vera* incorporado en nanopartículas poliméricas biodegradables, podría ser utilizado en fracturas y defectos para lograr una mayor y acelerada reparación a través del sistema de suministro secuencial del polisacárido.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

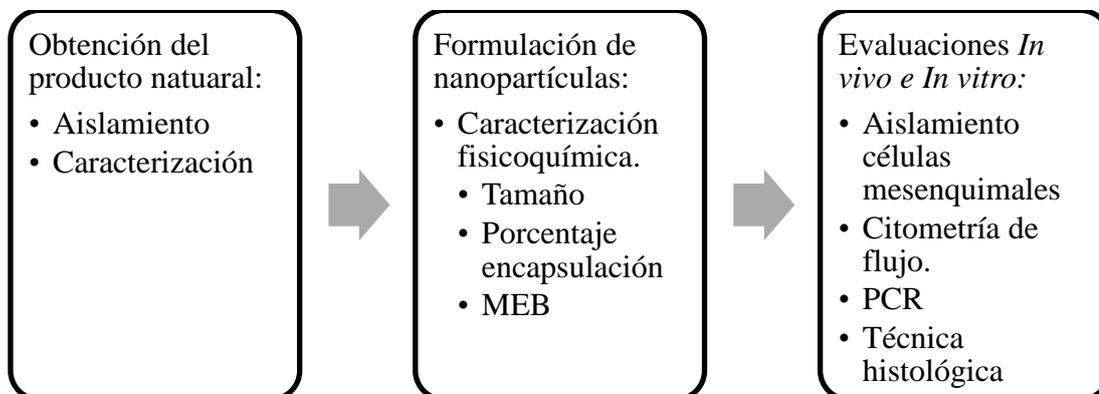
- Evaluar la capacidad regenerativa del aloinjerto de matriz ósea incorporado con nanopartículas con el polisacárido extracto de *Aloe vera*, en comparación con el tradicional aloinjerto de matriz ósea.

5.2 Objetivos particulares

- Aislar, purificar y caracterizar de extracto de *Aloe vera*.
- Estandarizar diferentes técnicas de preparación de vectores nanoparticulados de polímeros biodegradables con tamaño inferior a 300 nm.
- Desarrollar diferentes formulaciones de nanopartículas biodegradables que incorporen de forma individual el polisacárido con liberación sostenida.
- Determinar las características fisicoquímicas y propiedades farmacéuticas de las formulaciones de nanopartículas cargadas con extracto de *Aloe vera*: tamaño, morfología, y contenido de principio activo.
- Evaluar la actividad de inducción crecimiento in vitro de las nanopartículas cargadas con extracto de *Aloe vera* y adsorbidos a hueso sobre células ectomesenquimáticas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

La fase experimental de esta investigación se dividió en las siguientes etapas:



6.1 Aislamiento extracto de *Aloe vera*

El material vegetal se adquirió en centros de venta en la ciudad de Monterrey Nuevo León México y fue identificado por el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. El extracto de *Aloe vera* fue extraído desde el gel de la pulpa de la planta mediante precipitación con alcohol absoluto. (Figuras 3 y 4) Las hojas maduras de *Aloe vera* fueron lavadas y separada la piel del parénquima. El gel se obtuvo al colocar el parénquima en colador permitiendo su separación.



Fig 3 y 4. Hojas de *Aloe vera* para obtención de gel

Posteriormente, el gel fue mezclado con alcohol absoluto a una proporción de 1:5, y fue separado mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min, de lo cual se obtuvo un precipitado opaco, el que se redisolvió en agua para repetir el proceso de precipitación por alcohol, posteriormente se secó, se congeló y liofilizó, para finalmente obtener un extracto en polvo puro. (Figuras 4 y 5)

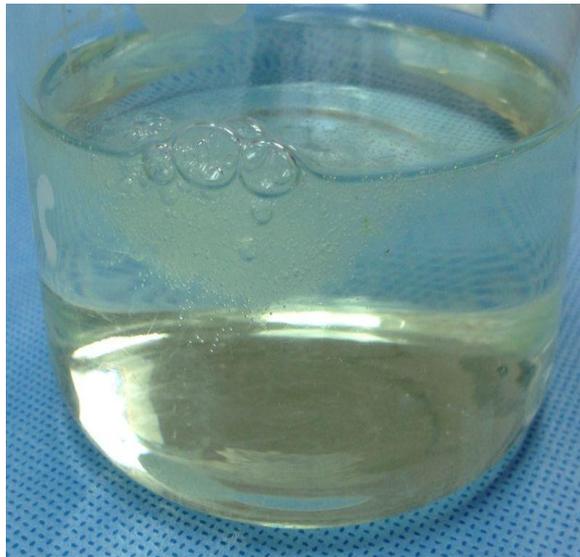


Fig 5 y 6. Obtención de precipitado al disolver gel de Aloe vera en alcohol absoluto

6.2 Caracterización parcial del extracto

El peso molecular de las partículas molidas fue analizado utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento conectada a un detector de índice de refracción. La separación fue realizada en una columna Shodex Sugar KS-804 y comparada con la estándar Shodex P-82. La composición de monosacáridos fue analizada empleando cromatografía de gases.

6.2.1 Perfil de Carbohidratos:

Preparación de la Muestra:

Se determinó la concentración de acemanano y el contenido de Carbohidratos en el extracto obtenido de *Aloe vera*. Para el caso de acemanano se pesó 1.12 mg del extracto y se disolvió en 1 mL de H₂O, se sonicó durante 10 min, se filtró con filtro de 0.22 µm y se inyectaron 30 µL en un Cromatógrafo de Líquidos (Perkin Elmer SERIES 200 Detector Índice de Refracción). Se utilizó una columna SUPELCO TSKgel G 5000 PWXL 30 cm x 7.8 mm y como fase H₂O desionizada con un flujo de 0.6 mL/min con temperatura en la columna de 60 °C y en el detector a 50 °C. En las mismas condiciones se realizó una curva de calibración utilizando estándar de acemanano, adquirido en la empresa Elycitol Oligotech.

Para la determinación de carbohidratos se pesaron 1.32 mg de la muestra del polvo y se hidrolizó con 5 mL de ácido trifluoro acético 1.0 M durante 14 horas a 85 °C, la muestra se evaporó a vacío a sequedad, se redisolvió a 2 mL con H₂O desionizada y se inyectaron 50 µL en un cromatógrafo de líquidos Varian 9002 con Detector de Índice de Refracción. Se utilizó una columna Animex HPX-87C Carbohydrate 300 mm X 7.8mm y como fase H₂O desionizada con un flujo de 0.6 mL/min con temperatura en la Columna de 60°C y en el Detector a 50°C. Se prepararon estándares de Arabinosa, Glucosa, Manosa y Galactosa, Galactosa y Xilosa, los culés se analizaron utilizando las condiciones cromatográficas arriba mencionadas.

6.3 Preparación de nanocápsulas

El proceso de nanoencapsulado para obtener un formulado con extracto de *Aloe vera* incorporado en nanopartículas poliméricas biodegradables objeto de la presente investigación y que cuente con las características ideales, es decir, tamaño promedio de partícula inferior a 220 nm, población homogénea en tamaño (PDI inferior a 0.200) y con eficiencia de encapsulación superior al 50%, comprendió implementar la técnica de doble emulsión evaporación a partir de la siguiente formulación inicial:

Ingredientes	Concentración (% p/v)
Ácidopoliláctico-glicólico (PLGA 85:15)	60 mg
Poloxámero 188	60 mg
Acetato de etilo	10 mL
Cloruro de magnesio	3%
Extracto de <i>Aloe vera</i>	20 mg
Agua	cbp 10 mL

Tabla 4. Formulación inicial de nanopartículas poliméricas biodegradables con extracto de aloe vera incorporado.

6.4 Estandarización de la técnica para preparar nanopartículas biodegradables

Para la preparación de las formulaciones de nanopartículas poliméricas se siguió la técnica doble emulsión ($W_2/O/W_1$) evaporación, en la que un volumen de 1 mL de solución acuosa (W_1) se adicionó a un reactor conteniendo la fase orgánica (O) y se someterá a homogenización durante 2 intervalos de 3 minutos/4 °C/ 14000 rpm (Homogenizador T-10 Basic IKA Alemania). Posteriormente, la primera emulsión (W_1/O) se adicionó por goteo moderado a la segunda fase acuosa (W_2) para formar la doble emulsión ($W_1/O/W_2$) y se mantuvo en agitación durante 40 minutos/4 °C/ 2000 rpm (Eurostar power-b Ika® - Werke). La doble emulsión se sometió a homogenización en 2 intervalos de 5 minutos/4 °C/ 14000 rpm. El control de temperatura se realizó utilizando reactores encaquetados conectados a un baño de recirculación.

Finalmente, la formulación se evaporó a presión reducida (Rotavapor Heidolph Laborota 4003 control) y de esta manera, se determina el tamaño de las nanopartículas así como el índice de polidispersidad y por espectroscopía de correlación fotónica (Zetasizer Nanoseries, Nano-Malver UK) a partir de una alícuota de las formulaciones preparadas. Así como se realizó la toma de una micrografía a través de microscopía electrónica de barrido (MEB).

La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas fue obtenida también mediante la encapsulación de la albúmina de suero bovino (BSA) mediante la misma técnica, su centrifugación y cuantificación mediante la técnica de espectroscopia. Para esto, la pastilla de nanopartículas fue disuelta en 1 mililitro de hidróxido de sodio 1M y neutralizado con 1 mililitro de ácido clorhídrico 1M. La proteína presente en éstos 2 mililitros fue cuantificada con la técnica de cuantificación de proteínas de Bradford (BioRad) y obtenido el porcentaje de encapsulación mediante una curva de calibración.

6.5 Porcentaje de carga de extracto en nanopartículas

Después de la elaboración de las nanopartículas poliméricas con extracto de *Aloe vera* incorporado, 10 mL de la suspensión final, se sometieron a centrifugación (25000 rpm/ 4 °C/ 3 h) para obtener el sobrenadante y pastilla de nanopartículas. La pastilla fue liofilizada fue disuelta con acetato de etilo y posterior a ello, se extrajo el carbohidrato con agua se liofilizó y se realizó la cuantificación por cromatografía de líquidos del extracto para calcular el porcentaje de carga en las nanopartículas y la eficiencia de encapsulación del proceso de encapsulación a través de la cuantificación de manosa por el método antes mencionado por hidrólisis de carbohidratos y análisis por HPLC-IR.

6.6 Estudios de liberación

Cantidades perfectamente conocidas de nanopartículas serán colocadas en viales con solución amortiguadora PBS pH 7.4 con agitación e incubados a 37°C para medir la liberación de carbohidratos en diferentes periodos de tiempo (1, 2, 4, 8 y 12 días).

Posteriormente se centrifugó cada sistema a 25000 rpm por 3 horas y el con el sobrenadante se determinó la cantidad de carbohidrato liberado será determinada por el método de HPLC descrito en el punto 6.2.1. La absorbancia se correlacionará con la concentración de extracto de *Aloe vera* por una curva de calibración. Los experimentos se llevaran a cabo por triplicado. Se analizaron los datos de liberación del activo evaluando los siguientes modelos: Orden cero, Primer orden, Higuchi

6.7 Carga de nanopartículas a hueso.

Hueso cadavérico estéril en polvo será tratado con suspensiones de nanopartículas. Se empleó por cada gramo de hueso 300 microlitros de las formulaciones y se procedió a la eliminación del solvente por secado a temperatura ambiente. El procedimiento podrá llegar a ser repetido con la finalidad de adherir en íntimo contacto un total de 800 ng de extracto incorporado a nanopartículas.

6.8 Microscopía electrónica de barrido

La estructura del hueso en polvo esterilizado con nanopartículas y la unión de las células sobre dicho hueso se evaluarán al inicio de los preparados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) después de revestimiento por pulverización catódica con oro. Las estructuras con células serán previamente tratados para su fijación con glutaraldehído (2,5% en buffer pH 7,4) durante 2 h y luego de varios lavados con buffer 7.4 y se liofilizarán antes del examen SEM.

6.9 Aislamiento y cultivo de células ectomesenquimáticas de médula ósea

Para el cultivo de células madre se utilizó medio de cultivo Advanced Dulbecco's Modified Eagle (Invitrogen, Carlsbad CA), suero fetal bovino (Invitrogen), Tripsina 0.25% (Invitrogen), gentamicina (Gibco, Carlsbad CA), penicilina/estreptomicina (Gibco), L-Glutamina (Gibco). Entre los materiales utilizados para cultivo celular se emplearon jeringas de 10mL estériles desechables, tubos de 15mL y 50mL (Corning, Costar City NY), pipetas serológicas desechables de 5mL, 10mL y 50mL (Corning), botellas de cultivo celular de 25cm², 75cm², 150cm² (Corning) y cajas petri de 100mm (J.VWRTM)

El cuidado de los animales utilizados durante los protocolos experimentales se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) dentro de los parámetros de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UANL.

Primeramente se obtuvieron células de tejido adiposo provenientes de borregos mediante lipectomía, y transportadas en buffer para su procesamiento. (Figura 7)



Fig 7 Obtención de tejido adiposo mediante lipectomía.

Posteriormente, se realizó una disgregación mecánica del tejido adiposo para después realizar una disgregación enzimática incluyendo la pieza de tejido en colagenasa tipo I a 37°C con agitación constante. (Figuras 8 y 9)

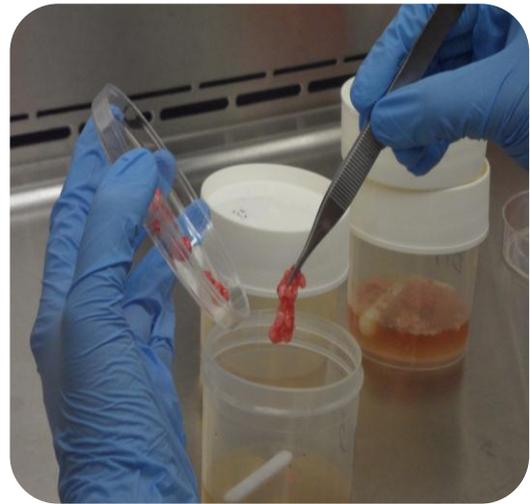
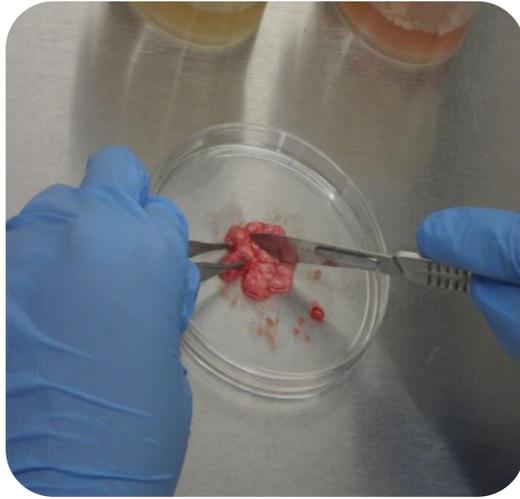


Fig 8 y 9. Disgregación mecánica de tejido adiposo para posteriormente realizar una disgregación enzimática con colagenasa tipo I a temperatura y agitación controladas

Posterior a la disgregación enzimática con colagenasa, el sobrenadante lipídico se separó del precipitado de células y éstas son transferidas a tubos falcon de 50 mililitros aforando con buffer al volumen total. (Figuras 10 y 11)

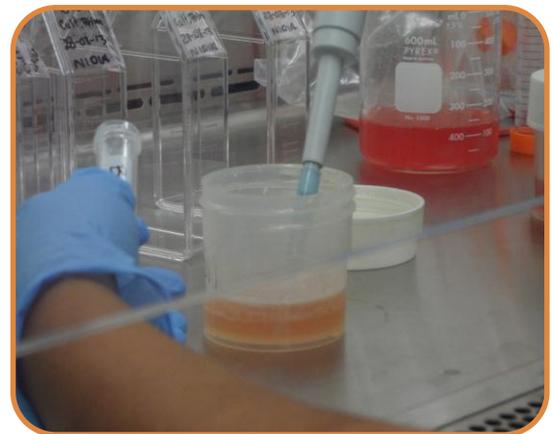


Fig. 10 y 11. Separación del precipitado y transferencia de células a tubos falcon de 50 mililitros

A continuación se realizó una centrifugación a 1800 rpm por 6 minutos y el sobrenadante es separado de la pastilla de células en el fondo. Esta pastilla de células es resuspendida en medio completo el cual contiene DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) 5% de suero bovino fetal y 500 microlitros de solución antibiótica-

antifúngica. Las células se reagruparon y cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Al segundo día del cultivo, las células no adherentes fueron cuidadosamente lavadas. El medio de cultivo será cambiado cada 2 días. Después de 7 a 10 días de cultivo, las células fueron subcultivadas. (Figura 12)

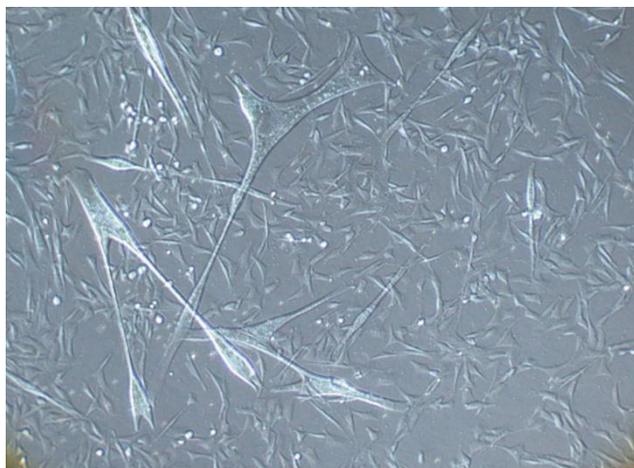


Fig 12. Células mesenquimales adheridas a la caja de cultivo

6.10 Citometría de flujo.

Para inmunofenotipificación se utilizaron 10⁶ células por animal utilizando anticuerpos anti-CD271-PE (Miltenyi Biotec), anti-MSCA-1 (W8B2) -APC (Miltenyi Biotec) y anti-CD45-FITC (Beckman Coulter). El analizador CyAn ADP (Beckman Coulter) se utilizó para las mediciones. .

Para inducir diferenciación y mineralización, las células fueron cultivadas en un medio convencional (DMEM), un medio mineralizante (medio de cultivo, 50 microgramos por mililitro de ácido ascórbico, 1 mM de beta-glicerofosfato y 0.1 micromolar de dexametasona) y un medio experimental, el cual contiene polvo de extracto de *Aloe vera* (Figura 13). Estos cultivos primarios serán almacenados con nitrógeno líquido hasta su uso.

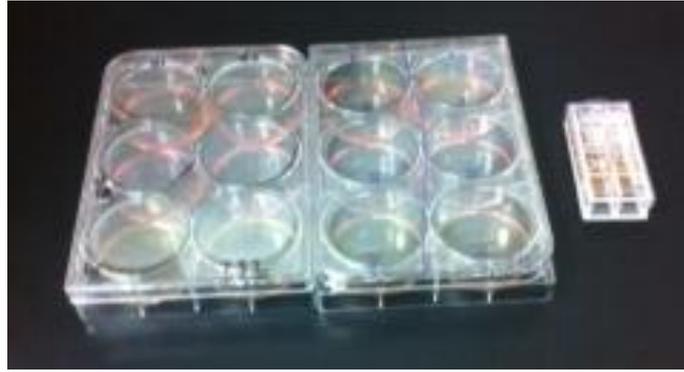


Fig. 13. Cajas de 2x3 para cultivo de Células con distintos medios de cultivo para realizar análisis de expresión y tinciones *histológicas*

6.11 Ensayos de diferenciación osteogénica in vitro.

Estos ensayos se subdividen en análisis histológico y análisis de expresión de mRNA

6.11.1 Análisis histológico

Se sembraron triplicados de cada grupo en cubetas divididas de 6 pocillos y se siguieron durante 8 y 16 días. Las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron en glutaraldehído al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo antes de tinción. La tinción de Von Kossa se utilizó para la evaluación de la matriz extracelular.

6.11.2 Análisis de la expresión de mRNA.

Se utilizó un análisis cuantitativo por RT-PCR para evaluar la expresión del colágeno tipo I usando GAPDH como un gen de referencia. El RNA total se aisló de células en cultivo a los 8 y 16 días usando el reactivo Trizol siguiendo el protocolo del fabricante. Su concentración se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher). El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de RNA total utilizando el kit iScript y se amplificaron los transcritos usando SYBR green y conjuntos de cebadores específicos (Col - I Fw 3' - 5' / Rv 3' - 5' y GAPDH Fw 3' - 5' / Rv 3' - 5').

6.12 Estudios in vivo

Fueron utilizadas 3 conejos machos producidos en el bioterio de la Facultad de medicina de la UANL, libres de patógenos específicos, de 16 semanas de edad y 2000 gramos de peso.

Los animales se dividieron en tres grupos de 1 cada uno, manteniéndose durante 48 horas en condiciones ambientales convencionales: temperatura 23°C, humedad 50/55%, iluminación 12 horas luz 12 oscuridad, con alimento balanceado comercial y agua autoclavada *ad-libitum*. Dos horas antes de la intervención quirúrgica se les retiró el alimento, manteniéndolos con dieta líquida.

Todos los conejos fueron operadas bajo anestesia general con ketamina 75mg/kg más 10 mg/kg por vía IM. Se depiló la piel en la zona del fémur, luego se realizó una incisión en piel con bisturí y se continuó en el plano muscular con tijeras por divulsión, hasta identificar el hueso.

Una vez limpio y retirado el periostio, se realizaron tres perforaciones de 9 mm de largo por 3 mm de ancho y 3 mm de profundidad, mediante fresas montadas en un motor eléctrico de cirugía. (Figura 14)



Fig.14 Defecto óseo generado en tibia de conejo.

Los defectos fueron injertados con los sustitutos óseos a evaluar, siendo los animales divididos en dos grupos más un grupo control sin tratamiento. (Figura 16) Una vez

finalizada, se realizó sutura por planos. Durante el postoperatorio, los animales permanecieron alojados bajo observación en el bioterio de animales de experimentación de la Facultad de medicina de la UANL.

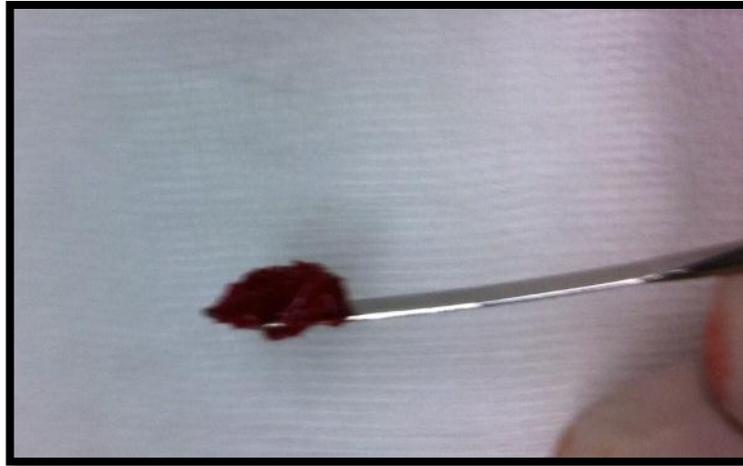


Fig. 15 Hueso liofilizado para ser injertado en defecto óseo de la tibia de conejo.

A las 4 semanas los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono y los fémures resecados mediante discos de corte de carburo. Luego las muestras fueron fijadas en formol al 10% a 4°C, descalcificadas en EDTA, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo, montadas y teñidas con hematoxilina y eosina para su posterior observación a través de un microscopio óptico..

En el procesamiento de las muestras, para la fijación del tejido se utilizó formalina y glutaraldehído al 2.5%. Para la descalcificación se utilizó EDTA, ácido fórmico y ácido clorhídrico. Las muestras se incluyeron en parafina después de una deshidratación con acetona. Los tejidos se dejaron en fijador por 4 días y posteriormente se colocarán por 5 días en EDTA al 15%, 10 volúmenes más que el tamaño del tejido para iniciar el proceso de descalcificación del hueso. Posteriormente se colocaron en ácido fórmico al 10% por 5 días y finalmente en ácido clorhídrico al 2.5% por 2 días más. Durante este proceso se midió la dureza del tejido al tacto. Pasado este proceso, el tejido se deshidrató con acetonas graduales y xilol y embebido en parafina para hacer cortes con microtopo.

Para las evaluaciones histológicas se utilizaron los siguientes colorantes y ácidos: ácido pícrico, formaldehido, ácido fosfomólfbdico, ácido fosfotúngstico, ácido

acético, azul de toluidina, tricrómico de Masson, tinción de Von Kossa, xilol, alcohol absoluto y alcohol de 96. Se realizarán técnicas de tinción: Hematoxilina y Eosina y Tricrómico de Masson (morfología celular, matriz amorfa, colágenas)

6.13 Análisis estadístico

Se evaluó la significancia estadística de los datos de expresión del gen de Col I determinados mediante la prueba de Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. ($p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo).

7. RESULTADOS

7.1 Obtención y caracterización del extracto de *Aloe vera*

Se obtuvo la composición parcial de carbohidratos por hidrólisis ácida mediante HPLC-IR. Los carbohidratos presentaron los siguientes tiempos de retención:

Compuesto	Tiempo de retención (Min)
Glucosa	14.35
Manosa	16.41
Arabinosa	18.41
Xilosa	15.71
Galactosa	16.11

En la figura se muestra el cromatograma del extracto donde se pueden apreciar la presencia de 5 componentes de los cuales tres fueron identificados por su tiempo de retención como Glucosa, Manosa y Arabinosa, en proporciones de 55.95 %, 24.34 % y 4.21 % respectivamente. Presenta dos compuestos más que no identificados que no son ni Galactosa, ni Xilosa.

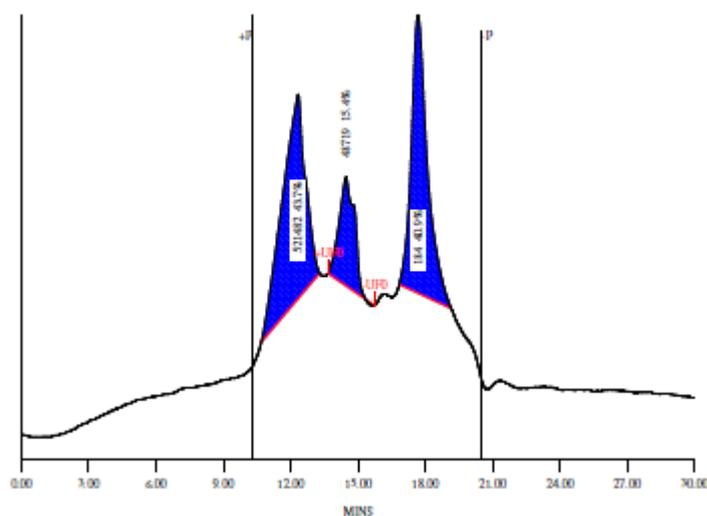


Fig.16 Cromatograma de extracto de gel de Aloe vera. Determinación de carbohidratos por hidrólisis ácida mediante HPLC-IR. L

7.2 Formulación de nanopartículas incorporadas con polvo de *Aloe vera*

Previo a los resultados definitivos obtenidos, se realizaron ensayos para estandarizar las técnicas de formulación. Dentro de los primeros resultados obtenidos destaca el mayor tamaño de nanopartícula además de un índice de polidispersidad más alto. La variable utilizada en este ensayo fue una mayor cantidad de tensoactivo.

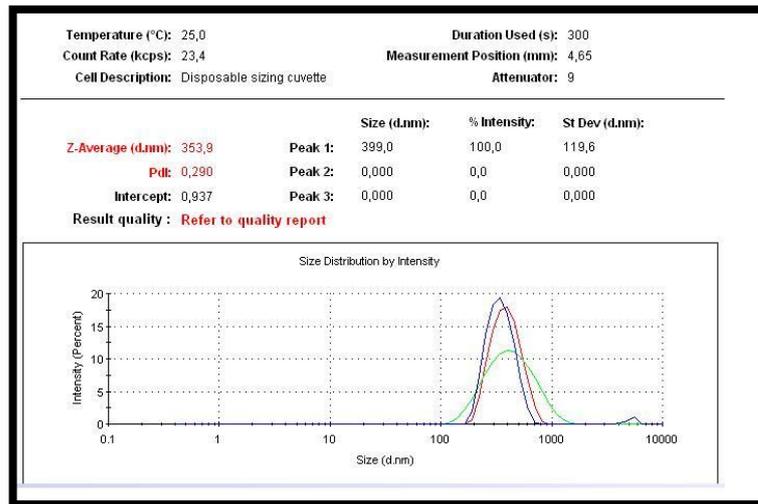


Fig 17. Tamaño de nanopartículas con una proporción de 1:1.5 de tensoactivo

La siguiente variable utilizada para perfeccionar la técnica fue modificar la cantidad de tensoactivo, esta vez a una proporción de 1 a 0.5 en relación al polímero, obteniendo resultados más cercanos al tamaño deseado, y con un índice de polidispersidad aceptable.

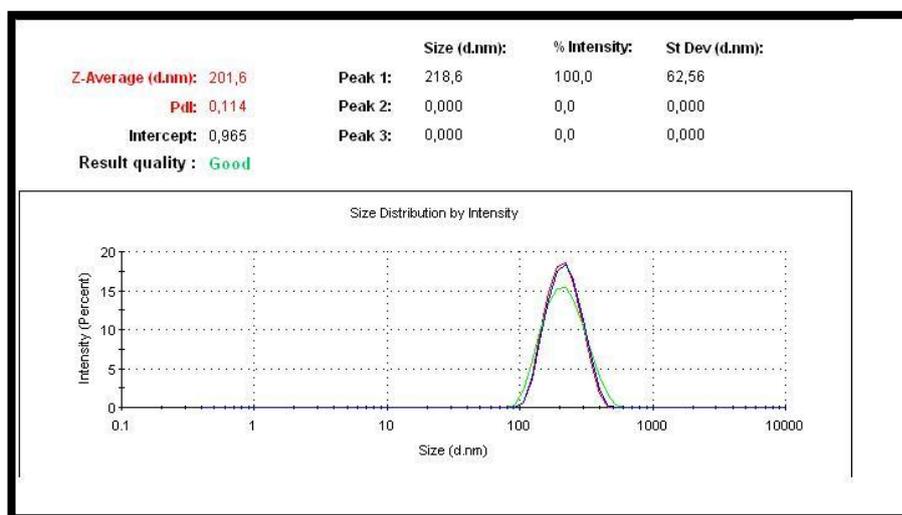


Fig. 18 Tamaño de nanopartículas con una proporción 1:0.5 de e tensoactivo. Nótese una disminución en tamaño y PDI

Con la técnica descrita en la metodología, los resultados del análisis de tamaño de partícula mediante la técnica de espectroscopia de correlación fotónica demostraron que el tamaño variaba entre 50 nanómetros hasta 900 nanómetros con un índice de polidispersidad poco variable en las formulaciones. Sin embargo, el rango más denso en cuanto a tamaño de partícula resulto entre 100 y 300 nanómetros. Todas las formulaciones presentaron un potencial Z negativo de entre -3.6 a -4.73 mV.

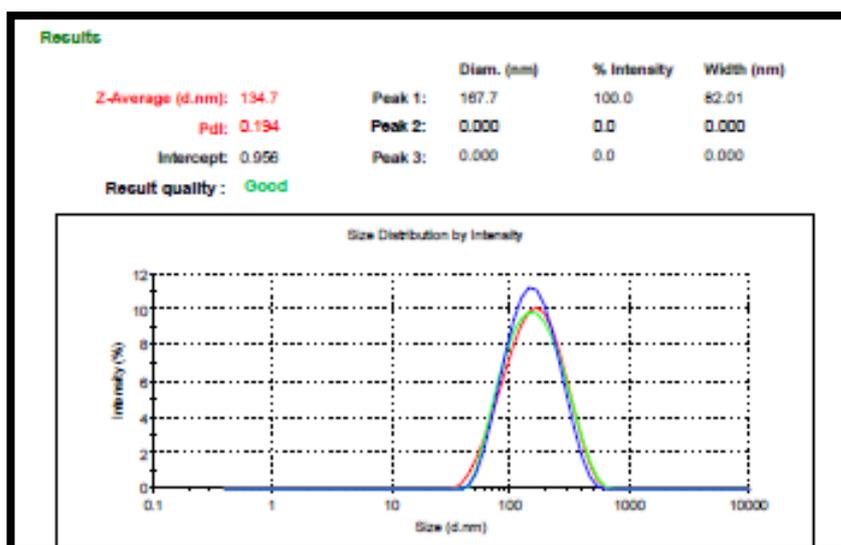


Fig. 19 Tamaño promedio de nanopartículas con una proporción de 1:1 de polímero/tensioactivo evaluado mediante la técnica de espectroscopia de correlación fotónica.

Se realizó un análisis micrográfico, por microscopía electrónica de barrido de la formulación de nanopartículas poliméricas de PLGA con extracto de *Aloe vera*, y se observaron nanopartículas con una morfología esférica con una población homogénea en tamaño. Por medio de la herramientas del microscopio electrónico fue posible determinar que las nanopartículas presentan tamaño de aproximadamente 45 nm hasta 130 nm, estos resultados permiten confirmar los obtenidos por medio de espectroscopia de correlación fotónica donde se determinó un tamaño promedio de nanopartícula de 130 nanómetros con una dispersión en tamaño poblacional de 0.2 (Índice de polidispersidad). El lote de nanopartículas fue posteriormente colocado sobre hueso permitiendo que nanopartículas que encapsulan el extracto quedaran adsorbidas sobre la superficie ósea.

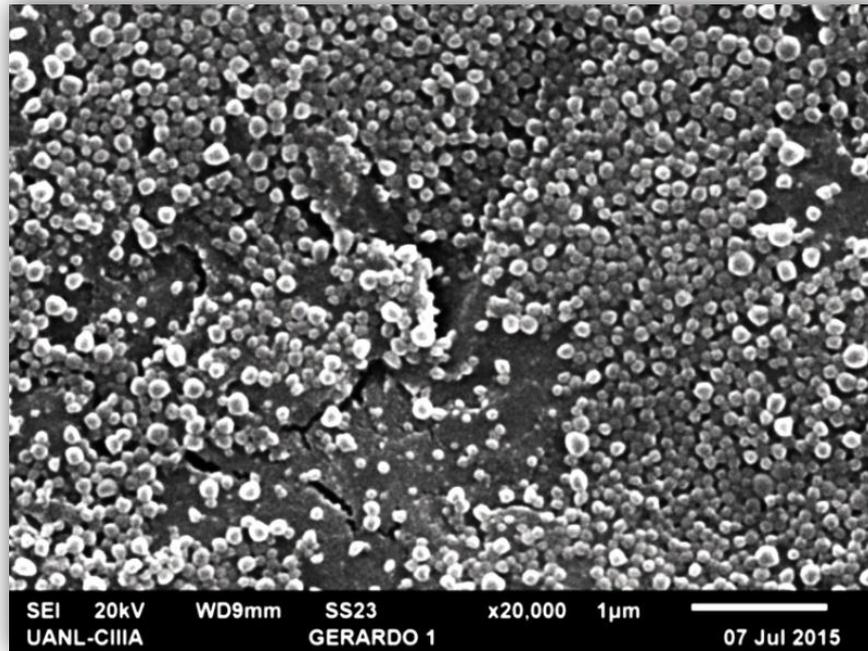


Fig.20 Micrografía por microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas poliméricas de PLGA incorporadas con extracto de *Aloe vera*

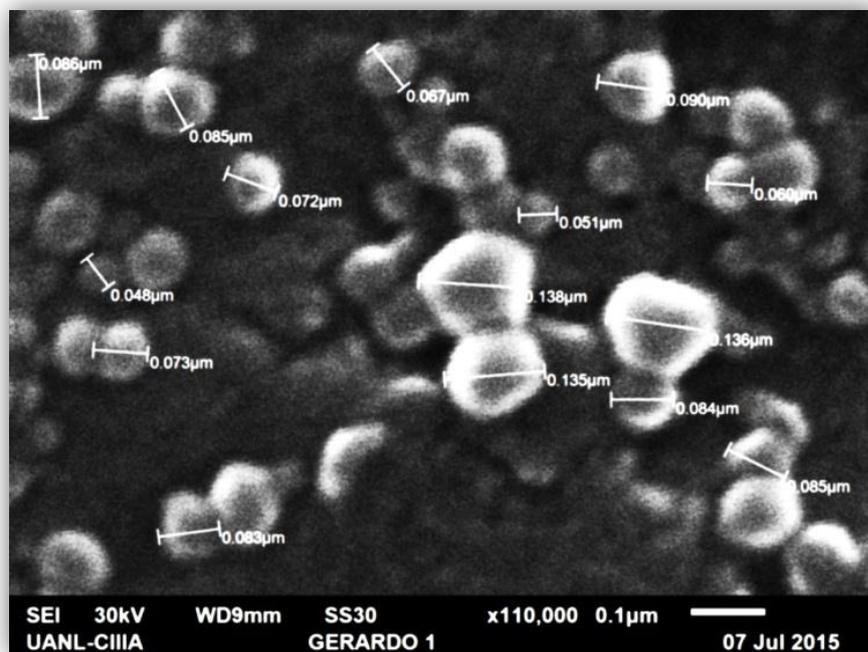


Fig. 21 Micrografía por microscopía electrónica de barrido de la formulación de nanopartículas poliméricas evaluando el tamaño.

7.2.1 Cuantificación del porcentaje de encapsulación en nanopartículas.

El porcentaje de encapsulación de polisacáridos determinado mediante hidrólisis de carbohidratos y seguimiento de manosa fue obtenido mediante un método de hidrólisis del polímero con ácido y base y cuantificado con una curva de calibración

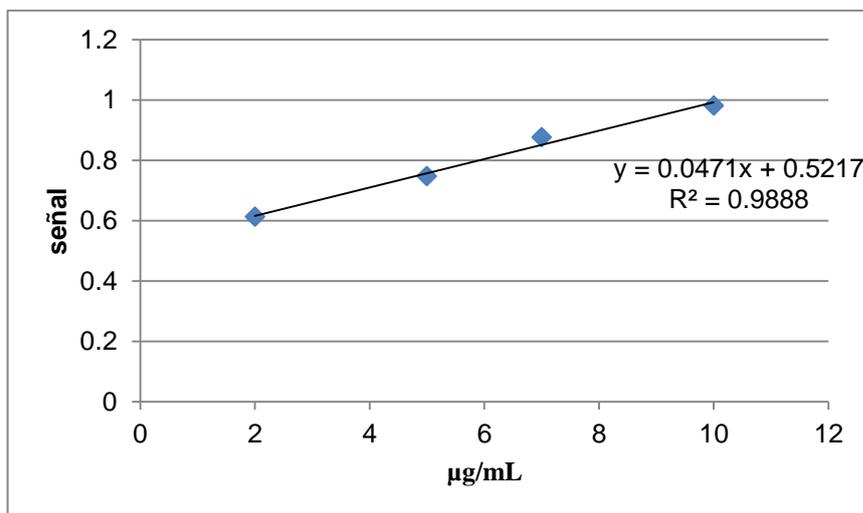


Fig. 22 Curva de calibración para cuantificación del porcentaje de encapsulación y liberación.

De acuerdo al análisis cromatográfico realizado por triplicado, se determinó que existe al menos un porcentaje de encapsulación de 80 ± 3 % del carbohidrato manosa en nanopartículas. De igual forma, posterior a la formulación de nanopartículas y su centrifugación, las cuantificaciones al sobrenadante resultaban máximas a un 5% de presencia de manosa no encapsulada dentro del sobrenadante cuantificada igualmente por el método cromatográfico antes descrito

7.2.2 Estudio de liberación

En la cinética de liberación encontramos que aproximadamente el 80% de lo encapsulado es liberado al primer día para que el 20% restante sea liberado gradualmente.

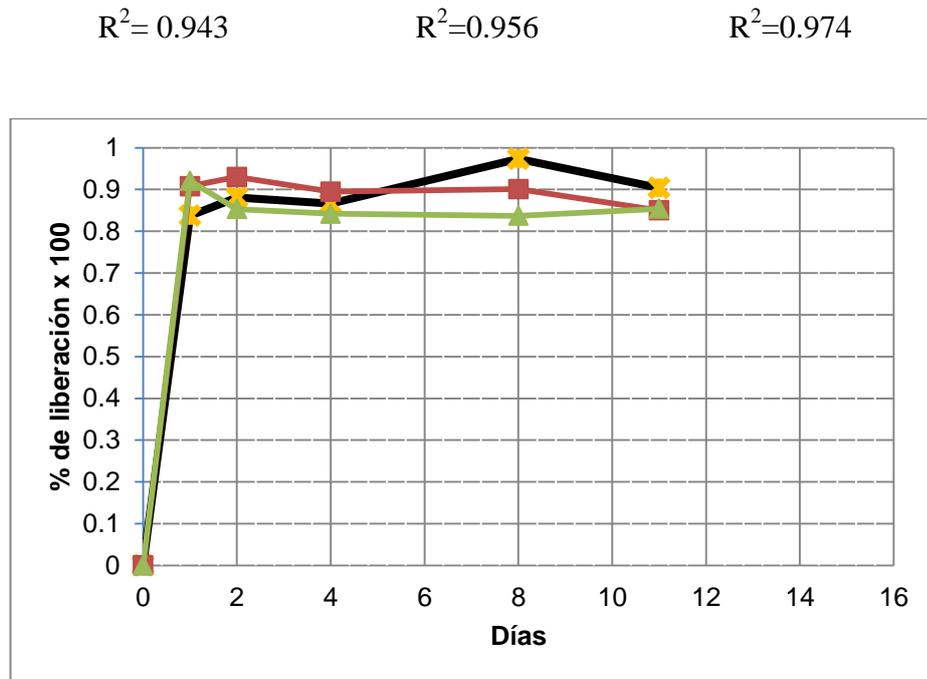


Fig 23 Cinética de liberación del activo a partir de nanopartículas de PLGA en distintos períodos de tiempo a pH 7 y 37°C

7.2.3 Incorporación de nanopartículas a hueso

Para su incorporación, el hueso fue hidratado con el lote de nanopartículas y dejado secar a temperatura ambiente en desecador por 4 días.

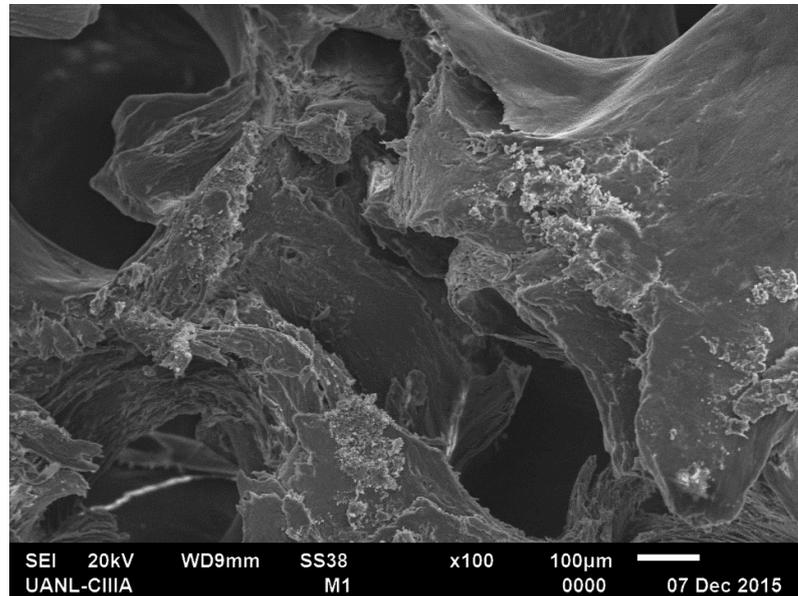


Fig 24. Fotomicrografía vista al microscopio electrónico de barrido (SEM) a 100x en el cual se observa una espícula de hueso pulverizado liofilizado al que le han sido incorporadas nanopartículas poliméricas.

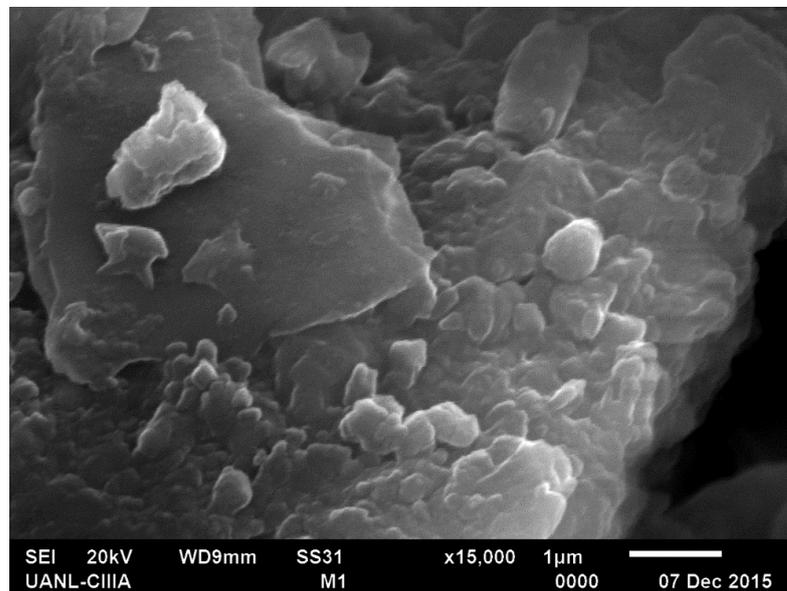


Fig. 25 Fotomicrografía vista al microscopio electrónico de barrido (SEM) a 15000x donde se observa la superficie de una espícula de hueso pulverizado liofilizado con la presencia de nanopartículas poliméricas adosadas a la superficie

7.3 Estudios *In Vitro* e *In vivo*

7.3.1 Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales y citometría de flujo

Se aislaron células madre mesenquimales de tejido adiposo proveniente de un adulto joven de *Ovis aries*. Tras 8 días de cultivo se observaron colonias de células adherentes de morfología alargada, en forma de huso, observándose al día 15 de cultivo una confluencia del 80% de las células madre mesenquimales. (Figura 26) Se realizó citometría de flujo para analizar la expresión de marcadores de superficie celular de las células mesenquimales, siendo positiva la expresión de CD29, CD44, CD105 y Sca-1.

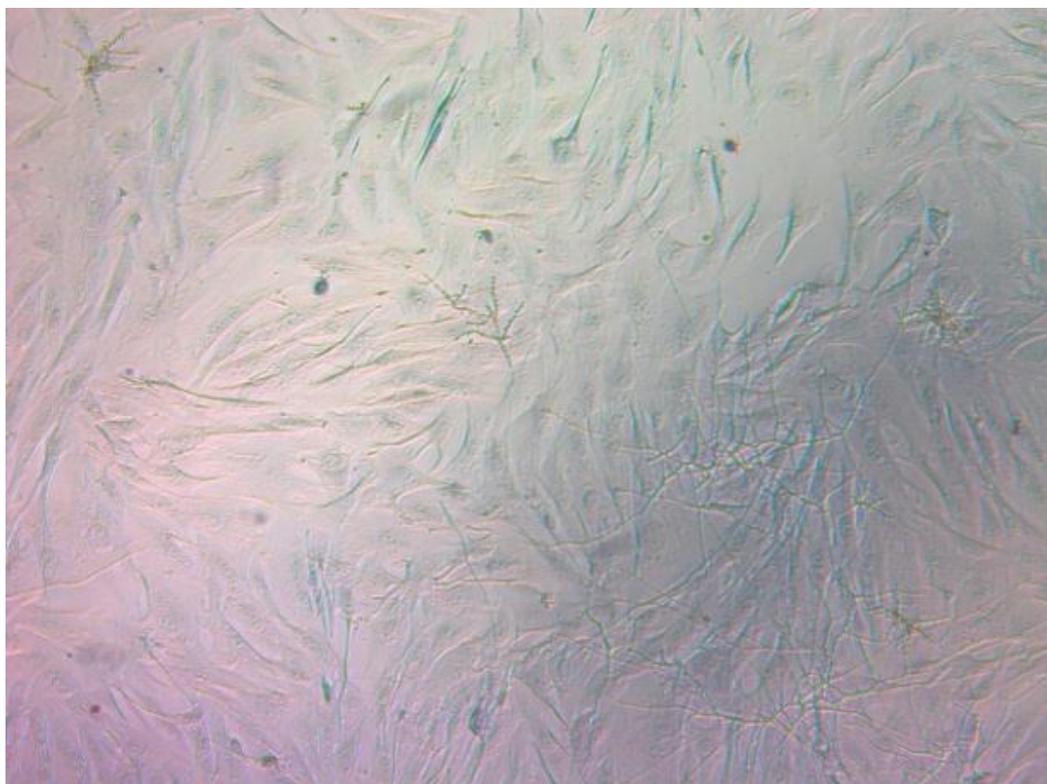


Fig. 26 Células mesenquimales indiferenciadas adheridas a la placa de cultivo.

7.3.2 Diferenciación osteogénica

La tinción de Von Kossa se utilizó para confirmar la diferenciación osteogénica. La presencia de regiones oscuras es indicativa de la matriz extracelular calcificada. La cantidad de nódulos mineralizantes observados en células cultivadas en medios osteogénicos y medios de cultivo enriquecidos con *Aloe vera* fue mayor que la

cantidad media de nódulos observada en medio de cultivo regular. Estos resultados indicaron que las células cultivadas en medio osteogénico y que contienen extracto de *Aloe vera* forman grupos de células y depósitos minerales. (Figuras 27, 28, 29 y 30)

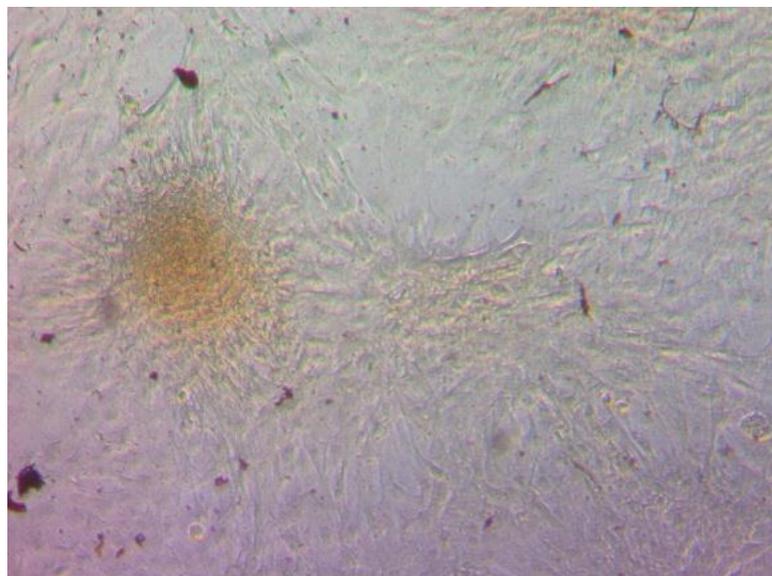
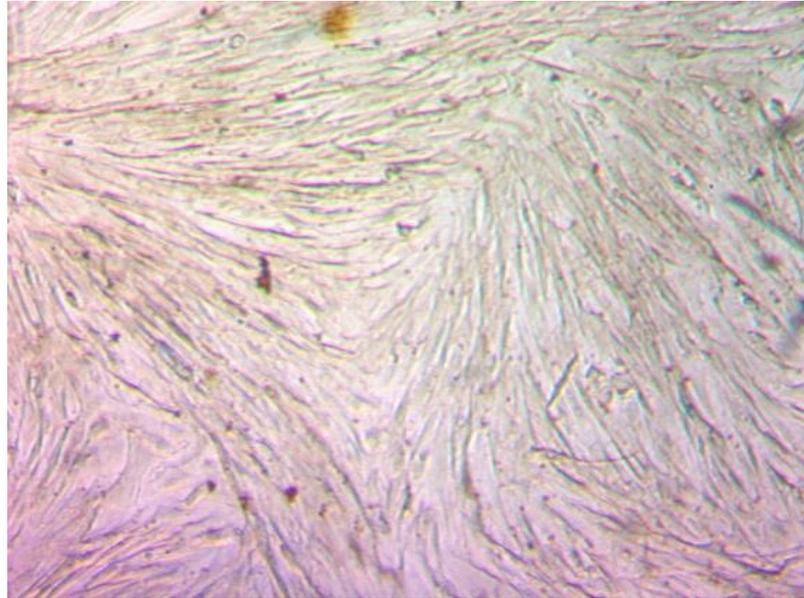


Fig. 27 y 28 Células mesenquimales inducidas a diferenciación con medio osteogénico a los 8 y 16 días teñidas con la tinción Von Kossa. Nótese la presencia de nódulos mineralizados con un color más oscuro.

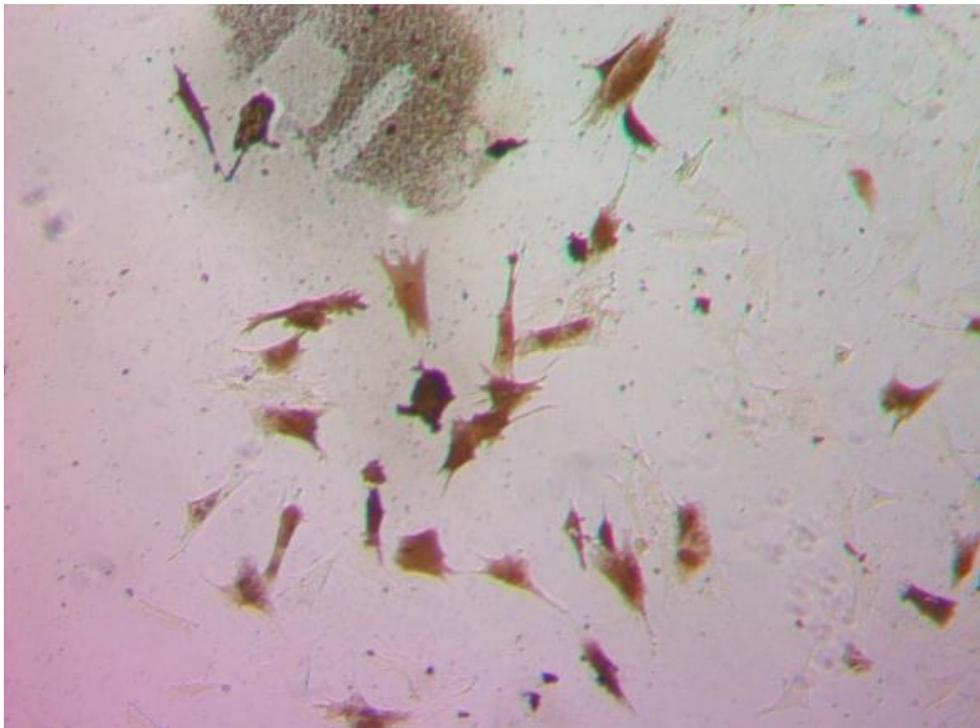
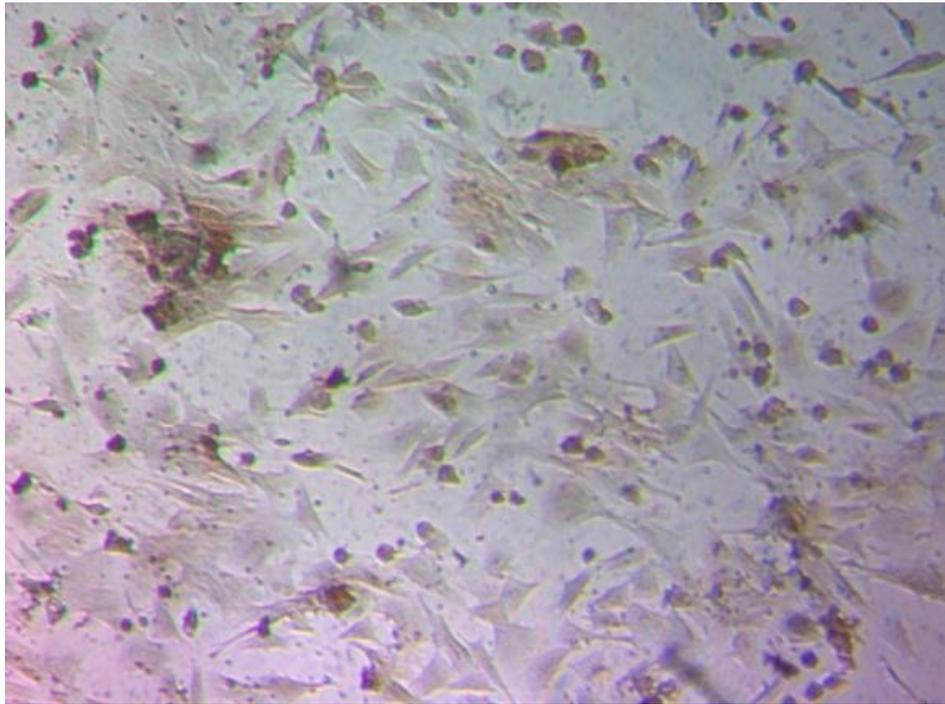


Fig. 29 y 30 Células mesenquimales inducidas a diferenciación con medio incorporado con aloe vera a los 8 y 16 días teñidas con la tinción Von Kossa.

7.3.3 Análisis de expresión de mRNA

Mediante PCR se evaluaron los niveles de expresión de los genes de Colágeno tipo 1 en los distintos tratamientos y tiempo de exposición los cuales fueron: células madre mesenquimales estimuladas con medio osteogénico y células madre mesenquimales estimuladas con medio enriquecido con extracto de *Aloe vera* a los 8 días.

Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y los niveles de expresión fueron calculados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = (\text{promedio de Ct muestra}) - (\text{promedio de Ct endógeno})$, y $\Delta\Delta Ct = (\text{promedio de } \Delta Ct \text{ muestra}) - \Delta Ct \text{ negativo}$.

En este ensayo se observó que la expresión de Colágeno tipo 1 aumenta de acuerdo al tratamiento al que las células son sometidas. Las células estimuladas con medio osteogénico y con extracto de *Aloe vera* mostraron sobreexpresión del gen de Col I en comparación con las estimuladas con medio convencional a los 8 días. Al realizar ANOVA de una vía muestra si existe diferencia estadística entre los tratamientos y el control, de acuerdo a los valores. Pero puede observarse que al cambiar de tratamiento existe mayor expresión del gen COL I. Al realizar el análisis de medias se demuestra que los tratamientos muestran diferencia significativa con respecto al control. La expresión en T2 muestra diferencia de $p < 0.05$ y la expresión de T3 muestra diferencia de $p < 0.001$.

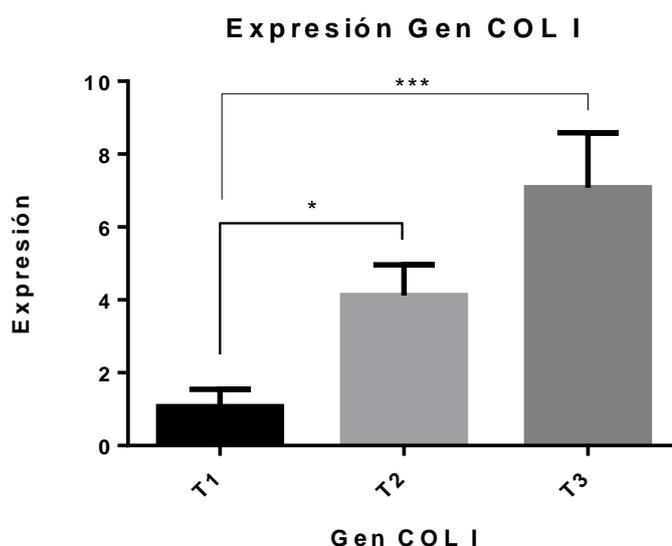


Fig 31 Expresión del gen de colágeno tipo 1 de acuerdo al tratamiento al que fueron sometidas las células a los 8 días

7.3.4 Evaluaciones *In vivo*

En el grupo control se observa en la zona de lesión la formación de un tejido fibrilar laxo con fibras precolágena muy delgadas y que no tienen organización. Se observan pocas trabéculas neoformadas, presencia de vasos sanguíneos y fibras de precolágena que se distinguen por su organización y sin orientación específica. Las trabéculas neoformadas son más irregulares en cuanto a tamaño espesor o grosor, se les observa rodeando a los fragmentos de hueso alogénico. (Figura 32)

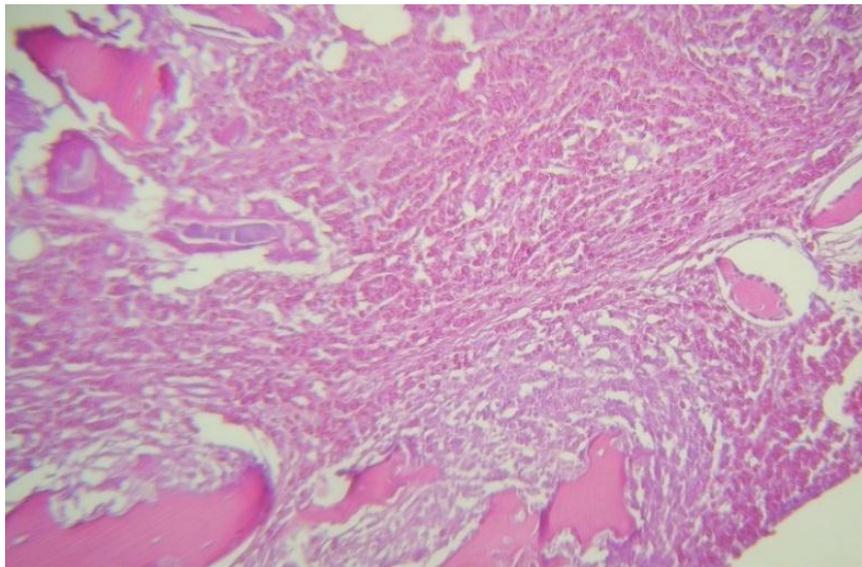


Fig 32 Corte histológico teñido con HyE de un defecto realizado en la tibia de un conejo rellenado con aloinjerto de hueso sin nanopartículas con extracto de Aloe vera, en la cual se observa una fibrosis incipiente y restos de trabéculas sin presencia de osteocitos u osteoblastos

Con el tricrómico de Mason se define la trama fibrosa del proceso de cicatrización con la presencia de vasos sanguíneos, En el grupo experimental de hueso incorporado con nanopartículas que encapsulan extracto de *Aloe vera*, en el defecto donde fue introducido el material se observan trabéculas con osteocitos en el interior de las lagunas. Sobre el hueso injertado se van formando nuevas trabéculas o hueso de neoformación. Presencia más notable de vasos sanguíneos y osteoblastos que rodean el hueso neoformado. No hay presencia de células inflamatorias más si de fibroblastos. Se distingue el hueso alogénico siendo reabsorbido por osteoclastos se definen las fibras con haces más gruesos, sustancia osteoide color rojo oscuro, que está en proceso de calcificación. La sustancia osteoide posteriormente será sustituida por hueso. (Figura 33)

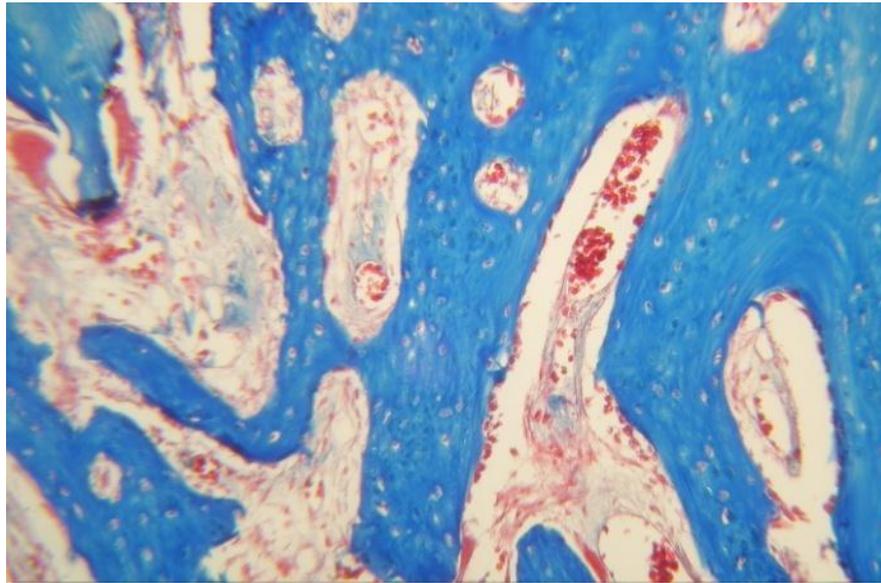


Fig 33 Corte histológico de tibia de conejo, teñido con la técnica de tricrómico de Masson, en el cual les fue realizado un defecto óseo y rellenado con hueso liofilizado con nanoparticulas con extracto de Aloe vera, donde se observa la presencia de hueso de neoformación y lagunas con presencia de osteocitos y osteoblastos en la periferia de las trabéculas óseas demostrando una mayor y más acelerada reparación del defecto

8. DISCUSION

La regeneración ósea es una de los retos más grandes que se enfrenta la medicina regenerativa. Sin embargo, debido a traumatismos, resecciones de tumores o anomalías congénitas son necesarias técnicas para regenerar la estructura ósea perdida para una rehabilitación del paciente. Los injertos óseos se usan prácticamente en todos los aspectos de la cirugía ortopédica reconstructiva y abarcan desde el tratamiento de fracturas hasta complejas técnicas de salvamento de extremidades en cirugía tumoral. La reparación ósea exitosa depende de varios factores, y la reparación ocurre bajo los mismos patrones de formación ósea (Fernández-Tresguerres et al 2006).

En los últimos años se han hecho esfuerzos por encontrar estrategias nuevas y eficientes para la regeneración de tejido óseo que sean menos dolorosas y que disminuyan el tiempo de este proceso para mejorar la calidad de vida del individuo. Este estudio fue enfocado a identificar la eficacia del hueso liofilizado incorporado con nanopartículas poliméricas cargadas con extracto de gel de parénquima de *Aloe vera* obtenido por precipitación alcohólica en la regeneración de defectos óseos y su comparación con el injerto óseo tradicional.

Una reparación ósea acelerada minimiza la reabsorción residual y mejora la calidad y cantidad del hueso neoformado. Las células mesenquimales tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos y producir hueso nuevo. *Aloe vera* ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional para tratamiento de quemaduras y heridas. También se ha utilizado con fines medicinales en varias culturas. Contiene alrededor de 75 componentes potencialmente activos como vitaminas, enzimas, minerales, azúcares, saponinas y aminoácidos. (Talamadge et al, 2004). En este sentido, cabe destacar el acemanano, el cual es un polisacárido presente en el gel de *Aloe vera*. (Sierra et al, 2014). Se ha demostrado que este carbohidrato estimula la diferenciación de células madre *in vitro* y la formación ósea. Chantawarit et al en 2013 investigaron el efecto de acemanano sobre la proliferación de las células del ligamento periodontal y su diferenciación a células formadoras de tejido duro, encontrando que éste compuesto aumentó la síntesis, diferenciación y mineralización de matriz extracelular *in vitro*. Es el mayor polisacárido presente en *Aloe vera*, funciona como una molécula bioactiva que induce a la formación de hueso al

estimular células mesenquimales a diferenciarse a osteoblastos y sintetizar matriz extracelular (Chantawarit et al 2013).

Además, se ha sugerido que su rol en la reparación de heridas es por su efecto inmunoestimulante, a través de la activación de macrófagos en la fase inflamatoria. Además, diversos estudios In vivo han demostrado que los grupos tratados con acemanano una mejor densidad de mineralización ósea y más rápida reparación en comparación con controles (Choi et al 2003).

En el presente trabajo se obtuvo un extracto de gel *Aloe vera* a partir de precipitación alcohólica del parénquima de hojas maduras con un rendimiento en peso seco de 0.95%. De acuerdo a lo reportado por Bozzi et al en 2006, este rendimiento se encuentra en lo esperado ya que la precipitación alcohólica solo extrae los solutos desnaturalizados por desolvatación. La adición de un solvente orgánico (etanol o acetona) produce agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en consecuencia una disminución en la solubilidad de ésta.

Al determinarse la composición parcial de carbohidratos del precipitado obtenido por hidrólisis ácida mediante HPLC-IR se puede observar que la composición y abundancia relativa fueron Glucosa, Manosa y Arabinosa, en proporciones de 55.95%, 24.34 % y 4.21 % respectivamente esto es congruente con estudios similares como Femenia et al (2003) que cuantificaron la composición de carbohidratos extraídos del gel de *Aloe vera* encontrando manosa, glucosa y galactosa en proporciones similares.

Para evaluar el efecto del extracto de *Aloe vera* en la neoformación ósea, se aislaron células mesenquimales de tejido adiposo de bovino para comprobar si la molécula induce a diferenciación. Las células madre mesenquimales de tejido adiposo fueron aisladas de un adulto joven de *Ovis aries*. Tras 8 días de cultivo se observaron colonias de células adherentes de morfología alargada. La presencia de células mesenquimales fue corroborada al realizarse una citometría de flujo para verificar la

expresión de marcadores de superficie celular típicos de las células mesenquimales, siendo positivos para CD29, CD44, CD105 y Sca-1 (Tocci y Forte. 2003).

Cabe mencionar que en esta investigación se decidió trabajar con tejido adiposo ya este ha surgido como una fuente alternativa de células madre porque el tejido puede obtenerse fácilmente y representa una fuente potencial de células madre adultas para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Células madre mesenquimales de tejido adiposo de bovino pueden ser fácilmente recolectadas y han sido aplicadas en tratamientos en animales, ya que poseen propiedades y morfología muy similares a las de médula ósea, lo que las convierte en una alternativa útil en medicina regenerativa. Grzeziak y colaboradores en 2011 caracterizaron células mesenquimales de tejido adiposo de bovino y encontraron una mayor presencia, tamaño y más rápida adhesión en comparación con otros cultivos celulares de otras especies animales. En el presente estudio, se emplearon éste tipo de células ya que presentan una alta tasa de crecimiento y habilidad para formar colonias. El resultado de la citometría de flujo fue positivo para CD44, lo cual de acuerdo a la literatura, es un anticuerpo específico de células mesenquimales de humano y ovino (Grzeziak et al 2011).

Una vez confirmada la presencia de células madre mesenquimales se procedió a evaluar si el extracto induce la diferenciación celular *in vitro*, el cual como se mencionó, presumiblemente era rico en acemanano. Se evaluó de forma cualitativa mediante la tinción de Von Kossa, la cual se utilizó para confirmar la presencia de mineralización en cultivos de células. Se pudo observar en los cultivos que la matriz extracelular mineralizada fue mayor en los medios de cultivo enriquecidos con extracto de *Aloe vera* que en medio de cultivo regular y semejante a la observada en el medio osteogénico. Este hallazgo nos permite suponer que el extracto empleado presenta los polisacáridos a los que se les atribuye actividad biológica, por ejemplo, el acemanano.

En este sentido, la presente investigación hasta este punto contaba con un aislado de la fracción rica en carbohidratos, caracterizado en base a monosacáridos y que mostró satisfactoriamente su desempeño biológico sobre células aisladas e identificadas como células mesenquimales presumiblemente promoviendo su diferenciación osteogénica, por ello el siguiente objetivo se encaminó a evaluar mediante PCR los niveles de expresión de los genes de colágeno tipo 1 de células

madre mesenquimales estimuladas con medio osteogénico y células madre mesenquimales estimuladas con medio enriquecido con extracto de *Aloe vera* durante un periodo de 8 días. En este ensayo se observó que no existe diferencia significativa entre la estimulación osteogénica de *Aloe vera* en comparación con el medio osteogénico. De acuerdo a nuestros resultados *in vitro*, se sugiere que el extracto rico en carbohidratos aumenta significativamente la síntesis de colágeno tipo 1. Previos estudios sugieren que acemanano también promueve la síntesis de factores de crecimiento desde fibroblastos.

Este resultado es relevante en si se considera que, en una lesión la fuente de las células reparadoras pueden ser las células indiferenciadas de los tejidos circundantes con capacidad para diferenciarse según sea necesario, y que el colágeno tipo 1 se encuentra abundantemente, entre otros tejidos, en el hueso. Este colágeno juega un papel importante después de una lesión ya que participa activamente en la cicatrización del tejido conectivo al proporcionar resistencia tisular y un marco de matriz extracelular para la adhesión celular y la migración (Fernandez Moure et al 2015, Shima et al 2015).

Por otro lado, es importante señalar que los polisacáridos presentes en el extracto de *Aloe vera* representan un material de origen vegetal que está disparando una señal en una célula eucariota. Se considera que este tipo de mensajes solo se da por péptidos o proteínas de origen igualmente eucariota como las BMPs. Songsiripradubboon S et al en 2017 comprobaron que acemanano, presente en el gel de *aloe vera*, promueve la proliferación de factores de crecimiento, incluida la BMP-2, que es una proteína que promueve la regeneración ósea, siendo así ésta la explicación de por qué un polisacárido de origen vegetal favorezca a la regeneración ósea (Songsiripradubboon S et al 2017).

En este contexto, el uso de moléculas bioactivas, solas o en combinación con otras técnicas de regeneración ósea se ha convertido en un área de interés gracias a su potencial. Para lograr este objetivo, es importante considerar el método de entrega del activo al sitio de la lesión. Estas moléculas pueden ser transportadas mediante una solución o gel, embebidas en esponjas, y más recientemente, incluidas en nanopartículas de diferentes tamaños (Ortega et al 2010.)

La elección de una adecuada técnica de formulación de nanopartículas depende de las propiedades fisicoquímicas del activo a ser encapsulado. En este estudio, la técnica de encapsulación utilizada fue la de doble emulsión, la cual minimiza la fuga del activo hidrofílico hacia la fase acuosa externa. Para la encapsulación del extracto de *Aloe vera* en nanopartículas empleamos la técnica de doble emulsión, la cual minimiza el escape del activo hidrofílico a la fase acuosa externa. El solvente orgánico empleado fue el acetato de etilo, el cual es más aceptable, farmacéuticamente hablando y se considera menos tóxico en comparación con otros solventes como diclorometano o cloroformo (Sela et al 2009).

Las nanopartículas están siendo ampliamente utilizadas para proteger moléculas bioactivas contra degradación, por ejemplo de enzimas, además de mantener la liberación y ser dirigidos a tejidos específicos. PLGA (ácido poli-láctico glicólico) es un polímero biodegradable aprobado para uso humano por la US Food and Drug Administration (Makadia et al, 2011). Este polímero existe en diferentes variedades con distintas características. Muchos estudios formulan sus nanopartículas con PLGA a una proporción 50:50. En nuestra selección decidimos por la proporción 85:15.

Las nanopartículas de PLGA fueron preparadas con la técnica de doble emulsión- evaporación. Esta técnica no requiere fuentes elevadas de energía, proporcionando así condiciones ligeras para la encapsulación de activos delicados (Blanco et al, 1997 y 1998). El tamaño promedio de las nanopartículas es menor a 150 nanómetros, y la distribución de tamaño de partícula fue monodispersa, con un índice de polidispersidad (PDI) menor a 0.2. Estos resultados concuerdan los obtenidos por otros autores (Parajo et al 2010, Santader Ortega et al 2010) la apariencia morfológica de las nanopartículas fue examinada por microscopio electrónico de barrido (SEM). Se obtuvieron nanopartículas con una forma esférica y una superficie lisa y el tamaño coincidió con el obtenido por la espectroscopía de correlación fotónica. A partir del seguimiento del carbohidrato masa se pudo obtener un porcentaje de carga de 4.9 % con una eficiencia del proceso del 71% similar a lo obtenido por otros autores (Csaba et al 2010).

Las nanopartículas obtenidas por el método anteriormente descrito, en donde se emplea el extracto de *Aloe vera* incorporado en polímero biodegradable nano

particulado fue posteriormente colocado en hueso permitiendo su adsorción sobre la superficie ósea. Esta etapa de la presente investigación constituye un aspecto adicional en la evaluación y desarrollo de nuevos elementos potenciales para la terapia de fracturas, así como todas las aplicaciones y usos derivados de la misma, tales como la regeneración ósea humana o animal, y ha sido elemento de protección intelectual la elaboración de una formulación de nanopartículas que encapsule de forma individual o asociada extractos de origen natural, fármacos y/o proteínas que sea depositada en hueso con finalidades terapéuticas, rehabilitatorias o profilácticas de importancia médica incorporados para su aplicación farmacéutica.

Se ha observado que nanopartículas de polímeros inocuos y biodegradables, tales como las nanopartículas formadas por el polímero ácido poliláctico-glicólico (PLGA) (preferentemente PLGA 85:15) con el extracto de *Aloe vera* incorporado en las nanopartículas, son capaces no sólo de mostrar una actividad osteoinductora, sino que también permiten potenciar la actividad residual del extracto de *Aloe vera* debido a que además de funcionar como un sistema de protección del extracto y ofrecen ventajas remarcables, tales como la protección del fármaco contra agentes externos que inducen su degradación, el direccionamiento del principio activo en sitios específico y la liberación de moléculas biológicas como proteínas, péptidos o carbohidratos.

En este contexto, el uso del autoinjerto sigue representando una gran alternativa en la reparación de defectos óseos. En el presente estudio, se evaluó *in vivo* un grupo experimental y un grupo control en el cual se evaluó el autoinjerto incorporado con nanopartículas con extracto de *Aloe vera* y el grupo de autoinjerto convencional. Nuestros resultados sugieren una diferencia significativa entre el grupo experimental y el grupo control, encontrándose una mayor osificación.

Estos resultados sugieren que la efectividad de la formulación de extracto de *Aloe vera* encapsulado en nanopartículas poliméricas biodegradables incorporadas sobre hueso promueve la actividad osteogénica y con ello la reparación más acelerada del defecto. La preparación de nanopartículas mostró un elevado porcentaje de encapsulación. Al ser incorporada la formulación de nanopartículas en hueso liofilizado y colocada en un defecto óseo mostró una más acelerada reparación en comparación con el grupo control debido a la presencia de extracto de *Aloe vera* el

cual al ser encapsulado cuenta con la ventaja de la protección brindada por las nanopartículas con una liberación in situ. Nuestros resultados sugieren una correcta encapsulación del extracto de *Aloe vera* de acuerdo a la caracterización fisicoquímica.

9. CONCLUSIONES

La presente investigación describe la nanoencapsulación de extracto de *Aloe vera* y la incorporación de dichas nanopartículas sobre hueso cadavérico. Dicho proceso permitió obtener un sistema nanoparticulado a base de copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA) y que se basa en la técnica modificada de doble emulsión (W1/O/W2) evaporación, la cual es implementada para producir nano cápsulas con tamaños alrededor de 150nm con la capacidad de proteger al extracto de factores ambientales y biológicos, como el pH, enzimas, etc.; además de permitir la liberación de los componentes del extracto en un sitio específico. Se cuenta con la técnica estandarizada para la incorporación en nanopartículas de moléculas con un alto porcentaje de incorporación. Las formulaciones muestran liberación del activo por varios días. Asimismo se cuenta con una formulación de nanopartículas con extracto de *Aloe vera* que muestra un alto desempeño en la regeneración ósea. Como conclusión final podemos establecer que de acuerdo a las evidencias presentadas, los polisacáridos presentes en el gel de Aloe vera funcionan como moléculas bioactivas que promueven directamente una reparación ósea, representando una potencial alternativa de tratamiento en el futuro.

10. PERSPECTIVAS

La presente investigación tuvo como objetivo encontrar una alternativa para promover la regeneración ósea de una forma acelerada y efectiva. Otras moléculas biológicas como las BMPs tienen una gran capacidad osteogénica, sin embargo su elevado costo puede convertir su terapéutica en algo inalcanzable. Aloe vera ha demostrado de sobra presentar moléculas capaces de inducir reparación ósea. Los resultados obtenidos en esta investigación representan una alternativa ante las opciones más costosas existentes en el mercado. Para poder establecer como opción de tratamiento la propuesta aquí descrita, son necesarios más estudios in vivo que demuestren la efectividad del extracto alcohólico del gel de parénquima de *Aloe vera* como material con potencial osteoconductor. Se requiere repetir los experimentos con un mayor número de sujetos experimentales, además contemplar diferentes dosis. De igual falta determinar In vivo la liberación dada por las nanopartículas que contengan el extracto de *Aloe vera* para garantizar su correcta entrega del activo encapsulado. Asimismo, contemplar estudios de esterilización que permitan garantizar este andamio propuesto para representar una alternativa de tratamiento. Estos andamios serán especialmente adecuados para utilizar en grandes defectos óseos, aportando soporte estructural y mecánico. Finalmente, se recomendaría estudios de toxicidad principalmente de las células de los tejidos en contacto con el constructo.

11. REFERENCIAS

1. Pinar Y, Sousa R.A, Reis R.L, Hasirci N, Hasirci V. (2010). Effect of scaffold architecture and BMP-2/BMP-7 delivery on in vitro bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21, (11): 2999-3008.
2. Bonifácio BV, Silva PB, Ramos MA, Negri KM, Bauab TM, Chorilli M (2014). Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *International Journal of Nanomedicine* ;9 :1-15. doi: 10.2147/IJN.S52634.
3. Park K.H, Kim H, Moon S, Na K. (2009). Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108, (6): 530-537.
4. Silva S.S, Popa E.G, Gomes M.E, Cerqueira M, Marques A.P, Caridade S.G, Teixeira P, Sousa C, Mano J.F, Reis R.L. (2013). An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*. 9: 6790-6797.
5. Jensen O.T. (2006). The sinus bone graft. *Quintessence*.
6. López-Martínez J.J, García-Sandoval P.P, Fernández-Hernández J.A, Valcárcel-Díaz A. (2012). Funcionalidad y osteointegración de los aloinjertos óseos en osteosarcomas de huesos largos. *Acta Ortopédica Mexicana*. 26 (1): 30-34.
7. Grover V, Kapoor A, Malhotra R, Sachdeva S. (2011). Bone allografts: A review of safety and efficacy. *Indian Journal of Dental Research*. 22 (3): 532-537.

8. Aghaloo T.L, Moy P.K, Freymiller E.G. (2005). Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clinical Oral Implants Research*. 16 (2): 250-257.
9. Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R. (2001). Estado actual de los injertos óseos. Biología, función, conservación, riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad e incorporación. *Revista Española de Cirugía Osteoarticular*.36 (205): 23-32.
10. Vogler B.K, Ernst E. (1999). *Aloe vera*: a systematic review of its clinical effectiveness. *British Journal of General Practice*. 49: 823-828.
11. Reynolds T, Dweck A.C. (1999). *Aloe vera* leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*. 68: 3-37.
12. Atiba A, Nishimura M, Kakinuma S, Hiraoka T, Goryo M, Shimada Y, Ueno H, Uzuka Y. (2011). *Aloe vera* oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor-B and fibroblast growth factor production. *The American Journal of Surgery*. 201(6): 809-818.
13. Boonyagul S, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpisal P. (2013). Effect of extracto de *aloe vera*, an extracted polysaccharide from *aloe vera*, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. *Odontology* 2013 Jan 12.
14. Davis, R.H., Leitner, M.G., Russo, J., (1987). Topical antiinflammatory activity of *Aloe vera* as measured by ear swelling. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. 77: 610–612.

15. Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. (2009). Extracto de *aloe vera* stimulates gingival fibroblast proliferation: expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *Journal of Pharmacological Sciences*. 109:525-531.
16. Azghani A, Williams I, Holiday D, Johnson A. (1995). A beta-linked mannan inhibits adherence of *Pseudomona aeruginosa* to human lung epithelial cells. *Glycobiology*. 5 (1): 39-44.
17. Egger, S., Brown, G.S., Kelsey, L.S., Yates, K.M., Rosenberg, L.J., Talmadge, J.E. (1996) Hematopoietic augmentation by a beta-(1,4)-linked mannan. *Cancer Immunology Immunotherapy* 43: 195–205.
18. Fogleman, R.W., Shellenberger T.E., Balmer, M.F., Carpenter, R.H., McAnalley, B.H., (1992). Subchronic oral administration of extracto de *aloe vera* in the rat and dog. *Veterinary and Human Toxicology* 34: 144–147.
19. Green, P., (1996). *Aloe vera* extracts in equine clinical practice. *Veterinary Times* 26:, 16-18
20. Harris, C., Pierce, K., King, G., Yates, K.M., Hall, J., Tizzard, I., (1991). Efficacy of extracto de *aloe vera* in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Molecular Biotherapy* 3: 207–213.
21. Kahlon, J., Kemp, M.C.X., Carpenter, R.H., McAnalley, B.H., McDaniel, H.R., Shannon, W.M., (1991) Inhibition of AIDS virus replication by Extracto de *aloe vera* in vitro. *Molecular Biotherapy* 3:127–135.
22. Kahlon, J., Kemp, M.C.X., Yawei, N., Carpenter, R.H., Shannon, W.M., McAnalley, B.H., (1991) In vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of extracto de *aloe vera* in combination with azidothymidine and acyclovir. *Molecular Biotherapy* 3: 214–223.

23. Lindblad, W.J., Thul, J., (1994). Sustained increase in collagen biosynthesis in extracto de *aloe vera* impregnated PVA implants in the rat. *Wound Repair and Regeneration* 2: 84.
24. Plemons, J.N., Rees, T.D., Binnie, W.H., Wright, J.M., Guo, I., Hall, J.E., (1994). Evaluation of extracto de *aloe vera* in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Wounds* 6: 40–45.
25. Stuart, R.W., Lefkowitz, D.L., Lincoln, J.A., Howard, K., Gelderman, M.P., Lefkowitz, S.S., (1997). Upregulation of phagocytosis and candididal activity of macrophages exposed to the immunostimulant, extracto de *aloe vera*. *International Journal of Immunopharmacology* 19: 75–82.
26. Tizard, I., Busbee, D., Maxwell, B., Kemp, M.C., (1994). Effects of Extracto de *aloe vera*, a complex carbohydrate, on wound healing in young and aged rats. *Wounds* 6: 201–209.
27. Llabot, J.M, Palma, S.D., Allemandi, D.A.; (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas. *Revista Nuestra Farmacia.*, 53:40-47.
28. Hasan, S. (2015). A Review on Nanoparticles : Their Synthesis and Types. *Res. J. Recent Sci.*, 4: 1–4.
29. Mohanraj V.J., Chen Y,. (2006). Nanoparticles. A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 5 (1): 561-573.
30. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarron M, Jerez LB (2006) Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11: E47-E51

31. Chantarawatit P, Sangvanich P, Banlunara W, Soontornvipart K, Thunyakitpisal P. (2013) Extracto de *aloe vera* sponges stimulate alveolar bone, cementum and periodontal ligament regeneration in a canine class II furcation defect model. *Journal of Periodontal Research*. May 28. doi: 10.1111/jre.1209.
32. Talamadge J, Chavez J, Jacobs L, Munger C, Chinnah T, Chow JT, Williamson D, Yates K. (2004) Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *International Immunopharmacology* 4: 1757-1773.
33. Sierra-Garcia GD, Castro-Rios R, Gonzalez Orta A, Lara-Arias J, Chavez-Montes A. (2014) acemanano, an extracted polysaccharide from *Aloe vera*: A literature review. *Natural Product Communications* 9(8); 1217-1221
34. Choi S, Chung MH. A review on the relationship between *aloe vera* components and their biologic effects. (2003) *Seminars in integrative medicine* 1: 53-62
35. Bozzi, A., Perrin, C., Austin, S., Vera, F. A. (2007) Quality and authenticity of commercial aloe vera gel powders. 103, 22–33.
36. Femenia, A., Garcia-Pascual, P., Simal, S., & Rossello, C. (2003). Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, 51(4), 397–405.
37. Tocci A. y Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. 2003. *The Hematology Journal*. 4(2):92-6.
38. Grzeziak J, Krzysztof M, Karol W, Joanna C (2011) Isolation and morphological characterisation of ovine adipose-derived mesenchymal stem cells in culture. *International Journal of Stem Cells* 4(2):99-104.

39. Fernandez-Moure JS, Corradetti B, Chan P, Van Eps JL, Janecek T, Rameshwar P, Weiner BK, Tasciotti E.(2015) Enhanced osteogenic potential of mesenchymal stem cells from cortical bone: a comparative analysis. *Stem Cell Research Therapy* 26;6:203. doi: 10.1186/s13287-015-0193-z.
40. Shima WN, Ali AM, Subramani T, Mohamed Alithen NB, Hamid M, SamsudinAR, YeapSK(2015) Rapid growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow. *Experimental Therapy Med* 9(6):2202-2206
41. Songsiripradubboon, S, (2017) Stimulation of Dentin Regeneration by Using Acemannan in Teeth with Lipopolysaccharide-induced Pulp Inflammation. *J Endodon* 43 , (7) , 1097 - 1103
42. Ortega-Oller I, Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, O'Valle F, Jódar-Reyes AB, Peula-García JM (2015) Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *Biomedic Research International* doi: 10.1155/2015/415289.
43. Cohen-Sela E1, Chorny M, Koroukhov N, Danenberg HD, Golomb G.(2009) A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled release*. 133(2):90-5. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.09.073
44. Singh SK, Makadia V, Sharma S, Rashid M, Shahi S, Mishra PR, Wahajuddin M, Gayen JR (2017) Preparation and in-vitro/in-vivo characterization of trans-resveratrol nanocrystals for oral administration. *Drug Deliv Transl Res* 7(3):395-407

45. Blanco MD, Alonso MJ (1997) Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43 287–294.
46. Blanco MD, Alonso MJ (1998) Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 45, 285–294
47. Parajó Y, d'Angelo I, Horváth A, Vantus T, György K, Welle A (2010). PLGA:poloxamer blend micro- and nanoparticles as controlled release systems for synthetic proangiogenic factors. *Eur J Pharm Sci*;41:644–9
48. Santander-Ortega, MJ., Csaba, N., González, L., Bastos-González, D., Ortega-Vinuesa, JL., Alonso, MJ., (2010). Protein-loaded PLGA–PEO blend nanoparticles: encapsulation, release and degradation characteristics. *Colloid Polym. Sci.* 288, 141–150.
49. Csaba, N., Sánchez, A., Alonso, MJ., (2006). PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *J. Control. Release* 113,164–172.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Gerardo Daniel Sierra García

Candidato para el grado de:

Doctor en Ciencias con acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: INCORPORACIÓN DE EXTRACTO DE ALOE VERA EN NANOPARTÍCULAS PARA ESTIMULACIÓN DE OSTEÓBLASTOS

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Datos personales: nacido el 13 de octubre de 1986 en la ciudad de Monterrey Nuevo León, hijo de Humberto Sierra Benavides y Minerva García Villanueva

Educación: egresado de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2008. Realizó estudios de Maestría en Endodoncia en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí entre 2010 y 2012.

Experiencia profesional: Profesor de pregrado y posgrado de la facultad de Odontología de la UANL desde 2012 a la fecha.

Nombres y firmas del comité de tesis

Presidente: Dr. Abelardo Chávez Montes.

Secretario: Dra. María Julia Verde Star

Vocal 1: Dr. Eduardo Sánchez García

Vocal 2: Dra. Azucena del Carmen González Horta.

Vocal 3: Dra. Adriana Núñez González

Alumno: Gerardo Daniel Sierra García

