

Citotoxicidad *in vitro* de soportes de quitosano/Mimosa Tenuiflora/Nanotubos de carbono de pared múltiple para tejido óseo

C. García-Ramírez¹, I. Olivas-Armendáriz², I.A. Medina-Ortega², C.A. Rodríguez-González², C.L. Vargas-Requena³, F. Jiménez-Vega³ y S.A. Martel Estrada^{3,*}.

¹ Instituto de Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México

² Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México

³ Instituto de Arquitectura Diseño y Arte, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México

*adriana.martel@uacj.mx

Resumen

Existe un gran interés en el desarrollo de nuevos materiales para la regeneración ósea. Los andamios elaborados con quitosano han demostrado ser una buena plataforma de adhesión para las células con el uso de otros materiales puede mejorar su viabilidad y capacidad de proliferación. En este reporte de investigación se presentan los resultados de la fabricación y caracterización de andamios realizados con quitosano, corteza de Mimosa tenuiflora (M. tenuiflora) molida y nanotubos de carbono, así como soportes de quitosano, extracto de M. tenuiflora y nanotubos de carbono. La porosidad evaluada por microscopía electrónica de barrido (SEM), mostró un mayor tamaño de poro empleando extracto de M. tenuiflora y 5% de nanotubos de carbono. La citotoxicidad de los materiales fue evaluada mediante por medio de cultivos *in-vitro* con células pre-osteoblásticas MC3T3; Los resultados mostraron que el uso de extracto de M. tenuiflora extracto y nanotubos de carbono (NTC) mejoran la viabilidad celular y evidencia una capa carbonatada o calcificaciones. Por último, se evaluó la expresión de los transcritos codificantes para osteocalcina (OCN) y factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1) utilizando como marcador constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los ensayos mostraron que la sobre expresión de los marcadores en el día 3 en todas las mezclas de los compositos evaluados con excepción del tratamiento 5E 80:20 5%. Lo cual demuestra el proceso de osteogénesis presente en 4 de los 5 tratamientos probados.

Palabras clave: Citotoxicidad, Expresión Génica, Mimosa Tenuiflora, Nanotubos de carbono, Quitosana.

1. Introducción

Los huesos cumplen la función de sostén y protección al cuerpo humano [1] y pueden ser fracturados por caídas, accidentes automovilísticos y agresiones diversas [2], las más frecuentes son las de antebrazo (20.9%) y muñeca (13.6%) con una mayor incidencia en mayores de 60 años [3]. Debido al prolongado tiempo de recuperación, la disminución de calidad de vida y el gran impacto económico se buscan nuevas propuestas relacionadas con regeneración ósea resultando pertinente desde los puntos de vista económicos y de salud poblacional.

La quitosana, es un polímero natural catiónico y biodegradable derivado de la quitina [4], con habilidad para ser combinado con moléculas bioactivas [5]. Exhibe propiedades estructurales similares a la matriz extracelular y tiene la capacidad de promover adhesión celular, proliferación y diferenciación

en fibras, películas, esponjas e hidrogeles [6]. Además, tiene la habilidad de enfatizar la respuesta biológica que mejora la formación de apatita [7], lo que la hace un material prometedor para ingeniería tisular de hueso. La Mimosa tenuiflora es parte de la familia Fabaceae-Mimosoidae [4]. Es una planta con amplios efectos curativos explorados por culturas indígenas, con compuestos para el tratamiento de úlceras venosas, agentes antidiabéticos [8]. La planta ha sido estudiada en películas para regeneración de piel sugiriendo que tiene propiedades que enfatizan la regeneración de tejido epitelial [4]. Los nanotubos de carbono poseen propiedades térmicas, eléctricas, magnéticas, ópticas y mecánicas, baja densidad y estabilidad química [9]. Anteriormente han sido utilizados en andamios propuestos para aplicaciones en ingeniería tisular de hueso [9, 10]. Los nanotubos de carbono tienen un rol importante para mejorar las propiedades mecánicas, físicas y eléctricas de las matrices de materiales poliméricos [11]. Los materiales basados en carbono han mostrado ser bioactivos, y no ser tóxicos en osteoblastos [12]. No obstante, a pesar de las aplicaciones previas, aún es necesaria investigación de los efectos de la incorporación y su concentración en las propiedades osteogénicas en andamios para ingeniería tisular.

Por los motivos anteriormente mencionados en esta investigación se evaluó la eficiencia de un compósito de Quitosano/ extracto de *M. tenuiflora*/ Nanotubos de carbono en un sistema *in vitro* utilizando una línea celular de osteoblastos MCT3T3.

2. Metodología

Mediante la técnica de separación de fases inducida térmicamente fueron elaborados compósitos de quitosano/ extracto de *M. tenuiflora*/ nanotubos de carbono (Ch/eMt/MWCNT) y quitosano/ *M. tenuiflora* molida/ nanotubos de carbono (Ch/Mtm/MWCNT) en una relación de peso 80/20/2% y 80/20/5% para ambos casos utilizando ácido acético glacial al 1 %, de acuerdo con un método reportado previamente [13]. Las muestras fueron entrecruzadas con una solución 10 mM de genipina en etanol 100%, sumergiendo los soportes por 30 min. Las muestras fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente. 24 h. La porosidad de los materiales compuestos fue calculada como un porcentaje de la densidad aparente vs la densidad en bulto de la muestra. El tamaño de poro y la distribución de poros fueron medidas usando el software Scandium Universal SEM Imaging Platform (Soft Imaging System) de las micrografías de SEM en magnificación original. Fueron usadas tres secciones transversales de cada soporte para estimar el tamaño de poros y fueron tomadas 100 mediciones para estimar la distribución.

Los compósitos fueron cortados con un bisturí en cubos de $\approx 0.1 \text{ cm}^3$ y posteriormente esterilizados sumergiéndolos por 30 minutos en alcohol al 70% y exposición de radiación de luz ultravioleta por 15 minutos (Labconco™ Purifier™ Class I and HEPA Filtered Safety Enclosure). Todas las pruebas fueron desarrolladas por triplicado. Después en cada compósito elaborado y un control de material de quitosano/ *M. tenuiflora* (80/20) se sembraron 5 000 células osteoblásticas de una línea celular de carcinoma de osteoblasto de ratón (MC3T3), lo cual se realizó en medio mínimo esencial alfa (α -MEM) adicionado con suero fetal bovino al 10% (SBF), ácido ascórbico (10 $\mu\text{g/mL}$), β -glicerofosfato 3 mM y antibiótico penicilina-estreptomina al 1%. Las condiciones de incubación fueron a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂, las distintas muestras fueron cultivadas a 3, 7 y 14 días (SL CO₂ incubator) [14]. La viabilidad fue determinada mediante la reducción metabólica de la enzima mitocondrial de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en formazán. Las células junto con los materiales fueron incubadas a 37 °C por 3 h, siendo empleado un material de quitosano/ *M. tenuiflora* molida 80/20 como control para los NTC. Posteriormente se añadieron 150 μL de dimetil sulfoxido (DMSO) y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 min. Se tomaron 200 μL de la solución de las células y se transfirieron a una placa de 96 pocillos; la absorbancia de las muestras fue leída en un lector

de microplaca UV/Visible a 570 nm (Microplate spectrophotometer Bench mark plus, BIO RAD). A partir de los datos obtenidos se determinó el número de células, usando una curva de calibración con diluciones de células cuantificadas por un contador automático [15]. La morfología y calcificación de los osteoblastos fue determinada mediante un estudio en microscopía electrónica (SEM). La biomineralización fue observada mediante la formación de hidroxiapatita, identificada con espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (FTIR-ATR spectrometer Nicolet 6700), la cual detectó los grupos funcionales característicos de hidroxiapatita [13]. Los resultados se muestran como resultado de matemáticas espectrales con la finalidad de que sean visibles los grupos funcionales de interés después de la incubación. La extracción de RNA fue realizada a partir de células cultivadas en los compositos a los 1, 3, y 7 días, utilizando TRIzol (Invitrogen Life technologies®). El proceso fue llevado a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El RNA fue cuantificado mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), donde la relación de absorbancia 260/280 debió ser superior a 1.7 [14]. La síntesis de cDNA a partir del RNA fue realizada por retrotranscripción utilizando el kit ImProm-II (Promega®, A3500) de acuerdo al protocolo del fabricante. La amplificación del cDNA fue realizada con Green Master Mix 2X (Promega®) para los biomarcadores de síntesis y mineralización ósea de osteocalcina, TGF B1 y GADPH de control, siguiendo el protocolo del fabricante. Para esto en tubos de PCR fueron colocados 12.5 µL de Master Mix, 1 µL de cebador sentido, 1 µL de cebador antisentido, 200 ng de templado (cDNA) y agua estéril para obtener un volumen final de 25 µL, posteriormente se colocaron en un termociclador con los programas para la desnaturalización, alineamiento y extensión de acuerdo a los previamente reportados [14]. Todos los datos obtenidos fueron evaluados en su significancia estadística utilizando la prueba t de Student. Los resultados son reportados como la media ± desviación estándar y las diferencias observadas entre los materiales compuestos fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

3. Resultados y Discusión

Los compositos de extracto y corteza molida de *M. tenuiflora* con una relación de 80/20/2% y 80/20/5% (quitosano/*M. tenuiflora*/ nanotubos de carbono) fueron observados en el SEM (Fig. 1A). La morfología de los compositos y su porosidad es de importancia para la regeneración ósea, pues en ella es donde son realizados los procesos de adhesión, proliferación y mineralización [16]. En las imágenes de los diferentes compositos se observa una estructura altamente porosa e interconectada en un tamaño de poro de 100-300 µm, aproximadamente. Las porosidades para los materiales compuestos elaborados fueron $92.51 \% \pm 1.08 \%$, 89.72 ± 5.04 , 87.62 ± 5.43 , 86.42 ± 5.43 para los compositos e *M. tenuiflora* 80/20/2%, e¹. *M. tenuiflora* 80/20/5%, *M. tenuiflora* m² 80/20/2% y *M. tenuiflora* m² 80/20/5% respectivamente. La distribución de tamaño de poro mostradas por los materiales compuestos se muestra en la Fig. 2. El amplio rango de tamaño de poro obtenido es fundamental para la formación de tejido óseo, ya que poros menores a 20 µm permiten el eficiente crecimiento de tejido suave, los poros entre 40 y 100 µm fomentan un incremento interno del osteoide y poros de tamaño de 85-190 µm influyen en la adhesión celular que permite su proliferación y mineralización [17]. La calcificación celular y mineralización fue confirmada a través de imágenes de microscopio electrónico de barrido, en la Fig. 1B se observan osteoblastos conglomerados y formando un velo en la superficie de los compositos, también se observa el inicio de secreción de matriz extracelular, lo que comprueba la proliferación en el material. En las micrografías se observa la expresión de diminutos cristales hexagonales de hidroxiapatita [14] y la migración a los poros internos del material, en el material extracto de *M. tenuiflora* al 80/20/5% se observa la calcificación y mineralización como una capa carbonatada de calcio.

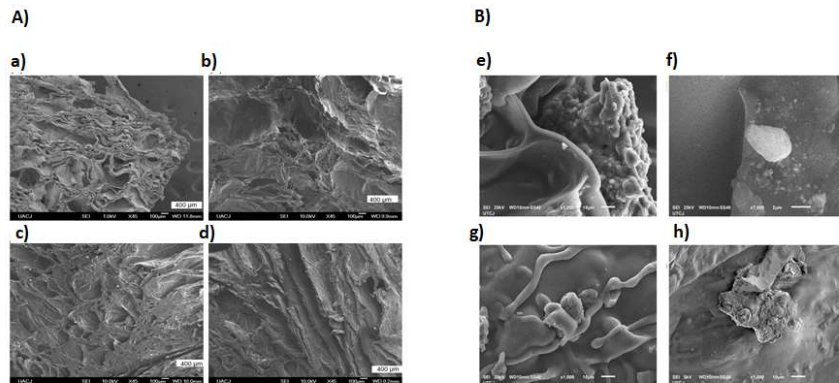


Fig. 1. A) Poros de compuesto de (a) *M. tenuiflora* molido al 80/20/2%, (b) *M. tenuiflora* molido al 80/20/5%, (c) extracto de *M. tenuiflora* 80/20/2% y (d) extracto de *M. tenuiflora* al 80/20/5%. B) Osteoblastos a los 14 días de cultivo observados por SEM, (e) extracto de *M. tenuiflora* 80/20/2%, (f) *M. tenuiflora* molido al 80/20/2%, (g) *M. tenuiflora* molido al 80/20/5% y (h) extracto de *M. tenuiflora* al 80/20/5%.

Todos los espectros obtuvieron bandas características los materiales que forman parte del material compuesto, en el caso del quitosano presenta un pico a los 3450 cm^{-1} correspondiente al estiramiento asignado al grupo OH, un enlace de estiramiento de C-H a los 2878 cm^{-1} , una Amida II (grupo CONHR) a los 1550 cm^{-1} y la Amida I a los 1661 cm^{-1} y 1655 cm^{-1} . Por otro lado, se observan bandas de absorción atribuidas a vibraciones relacionadas con el grupo C-H, a los 2923 cm^{-1} , estiramientos atribuidos a los alcoholes primarios (C-OH) a los 1027 y a 423 cm^{-1} . Mientras la *M. tenuiflora* presenta bandas características a los 1614 cm^{-1} y 1511 cm^{-1} de amida I y amida II, un grupo de p-xileno a los 843 cm^{-1} y a los 1033 cm^{-1} correspondientes a arabinogalactanos. La banda característica de los nanotubos de carbonos, en el rango de $1580\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ de C-C de estiramiento se encuentran solapadas (Fig. 3).

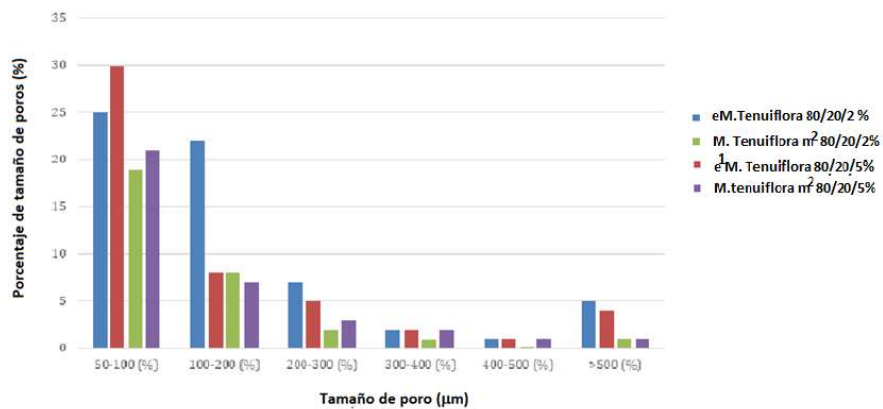


Fig. 2. Distribución de tamaño de poro (Notaciones: ¹e- extracto, ²m- molido).

En el análisis de viabilidad y proliferación celular (Fig. 3), la absorbancia obtenida fue proporcional al número de células proliferadas en el soporte, expresando las concentraciones de osteoblastos en los materiales compuestos con un 99.7% de coeficiente de correlación, por una relación lineal con la absorbancia obtenida en la lectura. La cual fue obtenida con base a la actividad metabólica mitocondrial

de las células, las cuales convierten el reactivo de bromuro 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol (MTT) en cristales de formazán. La mayor proliferación se dio en el día 14. Para el día 14 (Fig. 4) el crecimiento de células fue significativamente mayor, siendo el mayor crecimiento por parte del control y el material de extracto de *M. tenuiflora* al 80/20/5% los cuales no presentaron diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$), el control presentó diferencia significativa contra los demás materiales y el compósito a base de extracto de *M. tenuiflora* al 80/20/5% solo presentó diferencias significativas contra los materiales a base de *M. tenuiflora* molida, los cuales presentaron menor proliferación comparado contra todos los compositos y el control.

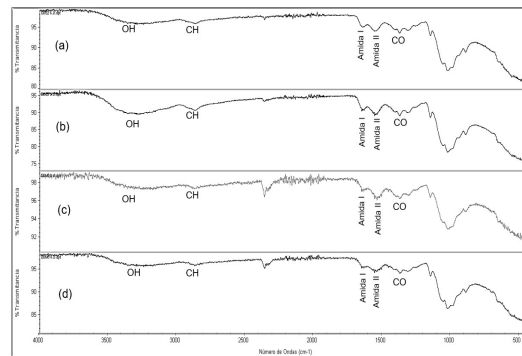


Fig. 3. Espectros s[A1]in cultivo de (a) extracto de *M. tenuiflora* 80/20/2%, (b) extracto de *M. tenuiflora* al 80/20/5%, de (c) *M. tenuiflora* molida al 80/20/2% y (d) *M. tenuiflora* molida al 80/20/5%.

La mineralización y calcificación fue confirmada mediante la observación de muestras de los materiales compuestos en SEM y FTIR. Los espectros de FTIR permitieron observar la presencia de los grupos funcionales de la hidroxiapatita. Con la finalidad de que pueda ser más apreciado el cambio y la presencia de los grupos funcionales de la hidroxiapatita en los espectros de las muestras con cultivo celular se muestran como un resultado de matemáticas espectrales, para evitar traslape con los grupos funcionales del material compuesto original. El compósito a base de extracto de *M. tenuiflora* 80/20/2% (Fig. 5), presentó el pico característico de $3600\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ característicos del enlace OH de estiramiento, dos picos a 2929 cm^{-1} y 2866 cm^{-1} correspondientes a enlace de estiramiento C-H, un pico de $1455\text{--}1410\text{ cm}^{-1}$ indicando la presencia de carbonato (modo estiramiento asimétrico), un pico en los 1024 cm^{-1} de PO estiramiento asimétrico y en el día 14 se observan un pico a 604 cm^{-1} seguido de uno a 567 cm^{-1} que corresponden al enlace del grupo fosfato [18]. Es importante señalar que la formación de matriz mineralizada está compuesta por una capa carbonatada de fosfato de calcio amorfo, el cual es precursor del hueso mineralizado y está presente en cantidades mayores en hueso joven, este proceso se explica porque al momento de la mineralización de hueso inmaduro se deben alcanzar primero altas concentraciones de iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} los cuales inducen la precipitación como fosfato de calcio amorfo, y después formar cristales de hidroxiapatita [19].

El RNA extraído es utilizado para la PCR retro-transcriptasa, misma que permite la cuantificación de la expresión génica. El RNA extraído de los diversos compositos sembrados presentó una buena concentración y alta pureza. Posteriormente fue sintetizado cDNA a partir del RNA extraído previamente. Todos los cDNA presentaron concentraciones óptimas en relación a los 200 ng requeridos, así mismo la pureza fue encontrada dentro del radio calificado como bueno. La amplificación por PCR de los cDNA fue observada en un gel de agarosa al aplicar la técnica electroforética (Fig. 6).

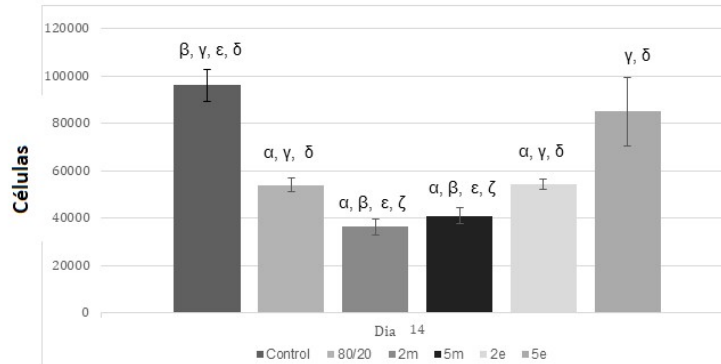


Fig. 4. Cuantificación celular al día 14 por ensayo de MTT, Control: células solas, 80/20: Quitosano/ extracto *M. tenuiflora*, 2m: *M. tenuiflora* molida al 80/20/2%, 5m: *M. tenuiflora* molida al 80/20/5%, 2e: extracto de *M. tenuiflora* 80/20/2% y 5e extracto de *M. tenuiflora* al 80/20/5%. α $p < 0.05$ vs Control, β $p < 0.05$ vs 80/20, γ $p < 0.05$ vs 2m, δ $p < 0.05$ vs 5m, ϵ $p < 0.05$ vs 2e, ζ $p < 0.05$ vs 5e.

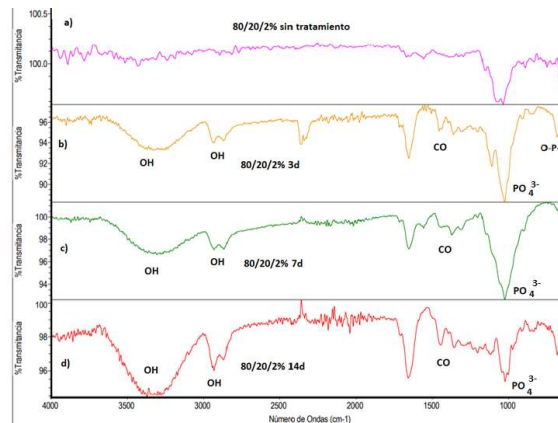


Fig. 5. Espectro de extracto de a) *M. tenuiflora* 80/20/2% sin tratamiento y del resultado de la resta entre el espectro original, y el espectro de los materiales con cultivo de osteoblastos al día b) 3, c) 7 y d) 14.

La intensidad de las bandas, representada muestra que el material 80/20 en el día 1 presentó la expresión de los diferentes genes. Los ensayos *in vitro* de la interacción entre osteoblastos con los diferentes composites sintetizados, mostraron la sobre expresión de los marcadores en el día 3 en todas las mezclas de los composites evaluados con excepción del tratamiento 5E 80:20 5%. Por último, en el día 7 solo se observó la expresión de osteocalcina con una intensidad media en el control. Lo anterior demuestra el proceso de osteogénesis presente en 4 de los 5 tratamientos probados. La expresión génica de los osteoblastos que no pudo ser observada podría deberse a que los NTC pueden causar daño a los ácidos nucleicos y además pueden tener una hibridación con los ácidos nucleicos por tener una solubilidad. Estas uniones se forman entre la superficie de los nanotubos de carbono y los átomos O4' o el O2' del anillo de la ribosa el cual forma un puente de hidrógeno con su grupo fosfato [20].



Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8%, se observa la amplificación por PCR de TGF B1(153 pb), GAPDH (207 pb) y Osteocalcina (212 pb). 2E: extracto de *M. tenuiflora* 80/20/2%, 5E: extracto de *M. tenuiflora* al 80/20/5%, 2M: *M. tenuiflora* molida al 80/20/2%, 5M: *M. tenuiflora* molida al 80/20/5%, CTL: control, 80/20: composite sin nanotubos de carbono.

4. Conclusiones

Los materiales compuestos desarrollados son biocompatibles por su capacidad de actuar en respuesta al medio biológico y poseen la porosidad requerida para llevar a cabo los diferentes procesos de la regeneración ósea. A medida que se aumenta el porcentaje de nanotubos de carbono en la muestra, el poro tiende a ser más pequeño debido a la compactación que produce. No obstante, el tamaño de poro es apropiado para obtener una buena adhesión y proliferación en un menor periodo de tiempo, tal y como lo mostraron los resultados. La adición de *M. tenuiflora* molida facilitó la proliferación celular.

La evidencia sugiere la formación de una capa carbonatada desde el tercer día, debido a la formación de grupos funcionales de PO₄³⁻ y CO. La intensidad de las bandas de expresión génica disminuyó en el día 7, debido posiblemente a la interacción del material con los nanotubos de carbono.

La discrepancia entre los resultados de los estudios de citotoxicidad, SEM y FTIR, con la expresión génica observada en el día 7, hace necesario futuros estudios para evaluar la biocompatibilidad de los andamios y asignar posible riesgo de uso de los nanotubos de carbono en las concentraciones propuestas.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés para este trabajo.

Referencias

- [1] M. Ross and W. Pawlina, "Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5 ta ed," Madrid: Editorial médica panamericana, pp. 268-302, 2008.
- [2] G. Riera-Espinoza, "Epidemiología de la osteoporosis en Latino América," Salud pública de México, vol. 51, pp. s52-s55, 2009.
- [3] C. A. C. Cure, P. C. Ramírez, L. P. Drago, and J. C. Peñaranda, "Frecuencia de Fracturas de Acuerdo al Sitio y su Relación con la Edad en Mujeres Postmenopáusicas," Rev. Colomb. Osteol. Metab. Miner, vol. 3, no. 1, pp. 27-31, 2004.
- [4] L. E. Valencia-Gomez et al., "Chitosan/Mimosa tenuiflora films as potential cellular patch for skin regeneration," Int J Biol Macromol, vol. 93, no. Pt A, pp. 1217-1225, Dec 2016.
- [5] A. Soriente et al., "Chitosan/PEGDA based scaffolds as bioinspired materials to control in vitro angiogenesis," Materials Science and Engineering: C, vol. 118, 2021.

- [6] F. Wang, Y. Pang, G. Chen, W. Wang, and Z. Chen, "Enhanced physical and biological properties of chitosan scaffold by silk proteins cross-linking," *Carbohydr Polym*, vol. 229, p. 115529, Feb 1 2020.
- [7] S. Singh, G. Singh, C. Prakash, S. Ramakrishna, L. Lamberti, and C. I. Pruncu, "3D printed biodegradable composites: An insight into mechanical properties of PLA/chitosan scaffold," *Polymer Testing*, vol. 89, 2020.
- [8] C. L. C. Meira, C. G. Novaes, F. C. Novais, V. d. S. de Jesus, D. M. de Oliveira, and R. M. Aguiar, "Application of principal component analysis for the evaluation of the chemical constituents of *Mimosa tenuiflora* methanolic extract by DLLME/GC-MS," *Microchemical Journal*, vol. 152, p. 104284, 2020.
- [9] R. J. Limon-Martinez et al., "Evaluation of *in vitro* bioactivity and *in vitro* biocompatibility of Polycaprolactone/Hyaluronic acid/Multiwalled Carbon Nanotubes/Extract from *Mimosa tenuiflora* composites," *Biomed Mater Eng*, vol. 30, no. 1, pp. 97-109, 2019.
- [10] S. Turk, I. Altinsoy, G. Celebi Efe, M. Ipek, M. Ozacar, and C. Bindal, "3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 92, pp. 757-768, Nov 1 2018.
- [11] F. Jahanmard et al., "Incorporation of F-MWCNTs into electrospun nanofibers regulates osteogenesis through stiffness and nanotopography," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 106, p. 110163, Jan 2020.
- [12] R. Eivazzadeh-Keihan et al., "Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone: Building new bone on small black scaffolds: A review," *J Adv Res*, vol. 18, pp. 185-201, Jul 2019.
- [13] S. A. Martel-Estrada, Olivas-Armendáriz, I., Peón-Prieto, L., Urquizo-Monreal, P., Hernández-Osuna, N., Martínez-Pérez, C.A., Hernández-Arellano, J.L., Santos-Rodríguez, E., "Thermal and Mechanical Properties of Chitosan / *Mimosa Tenuiflora* / Multiwalled Carbon Nanotubes Composite Developed by Thermally Induced Phase Separation," *Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 5, no. 1, pp. 7-13, 2015.
- [14] A. De la Paz, "Caracterización biológica de compositos de quitosana/ácido poli-L-láctico reforzados con nanotubos de carbono en células osteoblásticas de calvaria de rata," *Maestría en Ciencias Genómicas, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez*, 2012.
- [15] R. Budiraharjo, K. G. Neoh, and E. T. Kang, "Hydroxyapatite-coated carboxymethyl chitosan scaffolds for promoting osteoblast and stem cell differentiation," *Journal of colloid and interface science*, vol. 366, no. 1, pp. 224-232, 2012.
- [16] M. Stoppato et al., "Influence of scaffold pore size on collagen I development: A new *in vitro* evaluation perspective," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, vol. 28, no. 1, pp. 16-32, 2013/01/01 2013.
- [17] S. A. Martel-Estrada et al., "Chitosan/poly(DL,lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 23, no. 12, pp. 2893-901, Dec 2012.
- [18] Z.-Y. Cai, F. Peng, Y.-P. Zi, F. Chen, and Q.-R. Qian, "Microwave-assisted hydrothermal rapid synthesis of calcium phosphates: Structural control and application in protein adsorption," *Nanomaterials*, vol. 5, no. 3, pp. 1284-1296, 2015.
- [19] G. Gardner, *Endocrinología básica*, 9va. ed. México: McGraw Hill, 2012.
- [20] M. P. Landry et al., "Comparative Dynamics and Sequence Dependence of DNA and RNA Binding to Single Walled Carbon Nanotubes," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 119, no. 18, pp. 10048-10058, 2015.