

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**BIOCOMPATIBILIDAD DEL HIDROGEL DE MATRIZ ÓSEA BOVINA EN CÉLULAS  
MESENQUIMALES**

**NO. DE REGISTRO 2022-3**

**TESIS QUE PRESENTA:**  
**CD. INDIRA MARIEL MENDOZA CAMBEROS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

**DIRECTORES DE TESIS:**  
**DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA**  
**DR. MARCO ANTONIO RAMÍREZ SALOMÓN**

**ENERO 2022, CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO.**



Dirección General de Bibliotecas



U n i v e r s i d a d   A u t ó n o m a   d e   S i n a l o a

## REPOSITORIO INSTITUCIONAL

UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.



# FINANCIAMIENTO

Beca para estudios de posgrados CONACYT número 746919

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres.

A ti madre, Eva Camberos Ruiz, tus esfuerzos son impresionantes y tu amor es invaluable. Gracias, por apoyarme en la realización de mi sueño profesional, por tu positivismo y palabras de aliento que me hacen seguir cuando el mundo se torna difícil.

A ti padre, Jorge Alberto Mendoza Ruíz, por darme tu apoyo y tu amor incondicional, por ofrecer tu ayuda en los problemas que he enfrentado, por siempre estar ahí para mí.

Tengo tanto que agradecerles, porque a pesar de que sus consejos y enseñanzas guíen mi andar, me han permitido trazar mi propio camino y caminar con mis propios pies. Muchas gracias por confiar en mí y en lo que puedo lograr.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primeramente a la **Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar** por darme la oportunidad de ser parte de la 7° Generación de la Especialidad en Endodoncia. Por brindarme el regalo de cambiar mi vida para crecer profesionalmente y como persona.

Agradezco a todos **mis maestros** por haberme compartido sus conocimientos y por el interés siempre de vernos convertidos en los mejores. Por no sólo apoyarnos académicamente, sino también, por haberse convertido además en personas inolvidables que más que maestros se convirtieron en grandes amigos.

A las personas que me ayudaron a impulsar este proyecto hacia adelante; a mis asesores de tesis **Dr. Alfredo Ayala Ham, a la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina. A Germán Jiménez Gastelum** por su apoyo en la elaboración de este estudio.

Quiero agradecer a cada uno de mis endo-hermanos del posgrado, **Donagi, Paulina, Denisse, Karina, Emigdio, Mariela, Iliana y Ramsés** por ser parte de mi vida en estos más de dos años, por su compañía, apoyo, amistad y por haber convertido esta experiencia en una de las mejores de mi vida.

## RESUMEN

**Introducción:** La pérdida de tejido óseo es un problema a nivel mundial, comúnmente para tratar estas afecciones se emplean injertos óseos, sin embargo, este tratamiento presenta desventajas como transmisión de enfermedades y morbilidad del sitio donante, actualmente la ingeniería tisular ha desarrollado distintos biomateriales para hacer frente a estas dificultades. Los hidrogeles derivados de tejidos de MEC se encuentran en la categoría de andamios para guiar el crecimiento óseo más empleados y estudiados, por sus múltiples cualidades, como su alta biocompatibilidad y su capacidad de proporcionar un entorno semejante al tejido MEC nativo. **Objetivo:** evaluar biocompatibilidad del hidrogel de matriz extracelular ósea bovina y combinado con hidroxiapatita en células mesenquimales y macrófagos. **Materiales y Métodos:** se evaluó la viabilidad y proliferación celular de macrófagos y células mesenquimales en contacto con hidrogeles de matriz extracelular ósea bovina mediante el ensayo LDH y MTT. **Resultados:** los MO y las AD-MSc se mantuvieron viables durante el ensayo, la proliferación de MO y AD-MSc aumento gradualmente en los hidrogeles hMO y hMO +HA a las 24, 48 y 72 horas, a excepción de hMO+HA donde a las 72 horas existió disminución de proliferación de las AD-MSc. **Conclusiones:** los hidrogeles de matriz extracelular ósea bovina y con hidroxiapatita son biocompatibles *in vitro* sobre macrófagos y células mesenquimales.

### **Palabras claves:**

Matriz extracelular, hidrogel, biocompatibilidad, células mesenquimales

## ABSTRACT

**Introduction:** The loss of bone tissue is a worldwide issue, to treat these conditions bone grafts are commonly used, however, this treatment has disadvantages such as disease transmission and morbidity of the donor site, currently tissue engineering has developed different biomaterials to cope with these difficulties. Hydrogels derived from ECM tissues are in the most used and studied category of scaffolds to guide bone growth, due to their multiple qualities, such as their high biocompatibility and their ability to provide an environment like native ECM tissue. **Objective:** To evaluate the biocompatibility of bovine bone extracellular matrix hydrogel combined with hydroxyapatite in mesenchymal cells and macrophages. **Materials and Methods:** The viability and cell proliferation of macrophages and mesenchymal cells in contact with hydrogels of the bovine bone extracellular matrix were evaluated through the LDH and MTT assay. **Results:** MO and AD-MSc remained viable during the assay, proliferation of MO and AD-MSc gradually increased in hMO and hMO+HA hydrogels at 24, 48, and 72 hours, except for hMO+HA where at 72 hours there was a decrease in AD-MSc proliferation. **Conclusions:** bovine bone extracellular matrix hydrogels with hydroxyapatite are biocompatible *in vitro* on macrophages and mesenchymal cells.

### **Keywords:**

Extracellular matrix, hydrogel, biocompatibility, mesenchymal stem cells

# ÍNDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2 MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 Sustitutos óseos.....	4
2.1.1 Injertos.....	4
2.2 Ingeniería Tisular .....	6
2.2.1 Células empleadas en andamios.....	8
2.2.2 Factores de crecimiento .....	9
2.2.3 Biomateriales .....	10
2.2.3.1 Metálicos .....	10
2.2.3.2 Cerámicas.....	11
2.2.3.3 Polímeros.....	12
2.2.3.3.1 Polímeros naturales.....	12
2.2.3.3.2 Polímeros sintéticos.....	12
2.2.4 Biomateriales poliméricos.....	13
2.2.4.1 Esponjas .....	13



2.2.4.2	Nanofibras.....	14
2.2.4.3	Microesferas.....	14
2.2.4.4	Matrices.....	14
2.2.4.5	Hidrogeles.....	16
2.2.4.5.1	Matriz Extracelular.....	17
2.2.4.5.2	Hidrogel de matriz extracelular ósea.....	18
2.2.5	Biocompatibilidad.....	20
2.2.5.1	Líneas celulares.....	21
2.2.5.1.1	Macrófagos.....	21
2.2.5.1.2	Células Mesenquimales.....	22
2.2.5.2	Bioensayos de biocompatibilidad.....	23
2.2.5.2.1	Ensayo MTT.....	24
2.2.5.2.2	Ensayo LDH.....	25
2.3	Antecedentes.....	26
3	JUSTIFICACIÓN.....	29
4	HIPOTESIS.....	30
5	OBJETIVOS.....	31
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	31
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1	Lugar de obtención de la muestra.....	32
6.2	Tipo de estudio.....	32
6.3	Material Biológico.....	32
6.3.1	Hidrogel de Matriz Extracelular Ósea Bovina (HMO).....	32
6.3.2	Cultivo de líneas celulares.....	32

6.4	Metodología .....	33
6.4.1	Citotoxicidad y proliferación en hidrogeles de MEC.....	33
6.4.1.1	Ensayo de citotoxicidad (LDH) .....	35
6.4.1.2	Ensayo de proliferación (MTT) .....	35
6.4.2	Análisis estadístico .....	35
6.5	Lugar de realización.....	35
7	RESULTADOS.....	36
7.1	Evaluación de citotoxicidad mediante la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) .....	36
7.1.1	Macrófagos .....	36
7.1.2	Células Mesenquimales.....	37
7.2	Evaluación de la proliferación celular por reducción del compuesto MTT...	38
7.2.1	Macrófagos .....	38
7.2.2	Células mesenquimales.....	39
7.3	Evaluación morfológica celular .....	40
7.3.1	Macrófagos.....	40
7.3.2	Células Mesenquimales.....	43
8	DISCUSIÓN .....	45
9	CONCLUSIÓN .....	47
10	PERSPECTIVAS .....	48
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
12	ANEXOS.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los ensayos de biocompatibilidad. ....	34
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Triada de la ingeniería tisular. Los andamios, células y factores bioactivos se combinan y coordinan para regenerar el tejido deseado.....	8
Figura 2. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos sobre hMO y hMO+HA y grupo control. Mortalidad celular expresada en liberación de lactato deshidrogenasa en los diferentes hidrogeles y DMEM (muerte basal). .....	37
Figura 3. Ensayo de citotoxicidad en células mesenquimales sobre hMO y hMO+HA y grupo control. Mortalidad celular expresada en liberación de lactato deshidrogenasa en los diferentes hidrogeles y DMEM (muerte basal).....	38
Figura 4. Ensayo de proliferación de macrófagos sobre hMO y hMO+HA. Proliferación de MØ en los distintos grupos (hMO, hMO+HA, DMEM) en los tres tiempos de evaluación. Se observa aumento gradual en hMO y hMO+HA. ....	39
Figura 5. Ensayo de proliferación de AD-MSC sobre hMO y hMO+HA. Proliferación de AD-MSC en los distintos grupos (hMO, hMO+HA, DMEM) en los tres tiempos de evaluación. Se observa aumento gradual en hMO en todos los tiempos, hMO+HA muestra una disminución de proliferación a las 72 horas.....	40
Figura 6. Macrófagos observados con objetivo 40x sobre hMO (a) y hMO+HA (b). Morfología característica de macrófago no activado. ....	41
Figura 7. Imágenes representativas tomadas a 40x de MØ sobre hMO, hMO+HA y DMEM en los distintos tiempos de evaluación. ....	42
Figura 8. Células mesenquimales a 10x sobre hMO (a) y hMO+HA (b). Morfología característica de célula mesenquimal. ....	43
Figura 9. Imágenes representativas de AD-MSCs sobre hMO, hMO+HA y DMEM en los distintos tiempos de evaluación. ....	44

## ABREVIATURAS

MEC: matriz extracelular

TGF-B: factor de crecimiento transformante beta

BMP: proteína morfogénica ósea

IGF: factor de crecimiento insulínico

MSC: células madre mesenquimales

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

SS: aceros inoxidable

Co-Cr: cromo - cobalto

Ti: Titanio

PLLA: poli-acido L-láctico

PGA: poliglicólido

PLGA: poli l-lactida-co-glicólido

PCL: poli  $\epsilon$ -caprolactona

PDLLA: poli DL-lactida

PEE: poli éter éster

PEO: poli óxido de etileno

PBT: pterflalato de poli butileno

PEG: polietilenglicol

PVA: polivinílico

PAM: poliacrilamida

dECM: matriz extracelular descelularizada

DBM: matriz ósea desmineralizada

LDH: lactato deshidrogenasa

mPCs: células primarias de calota de ratón

bECM: matriz extracelular ósea bovina

bDBM: matriz ósea bovina desmineralizada

HBMSCs: células del estroma de la medula ósea humana

SCAP: células madre derivadas de la papila apical humana

DPSC: células madre de la pulpa dental

CS/Col: quitosano – colágeno

CS/HA/Col: quitosano – hidroxiapatita- colágeno

rBMSCs: células madre de medula ósea de rata

BMSCs: células madre de medula ósea

AD-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

MØ: macrófagos

hMO: hidrogel de matriz extracelular ósea bovina

hMO+HA: hidrogel de matriz extracelular ósea bovina combinado con hidroxiapatita

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

SBF: suero fetal bovino

# 1 INTRODUCCIÓN

Los problemas de salud asociados a la pérdida de tejidos son un problema común a nivel mundial y afectan considerablemente la calidad de vida de los pacientes. La pérdida de tejido óseo puede deberse a distintos traumatismos, patologías o procesos quirúrgicos.

Para abordar la necesidad de un material que sustituya los tejidos dañados, surge la medicina regenerativa o ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos tiene como objetivo desarrollar sustitutos biológicos funcionales que restauran, mantienen o mejoran la función de los tejidos mediante la combinación de un andamio, células y moléculas biológicas, que apoyan unión, proliferación y diferenciación celular.

Los polímeros son uno de los biomateriales de andamio más utilizados en la ingeniería de tejidos gracias a sus propiedades. Una de las propiedades es la transformación del polímero a un hidrogel. En comparación con otros biomateriales, los hidrogeles tienen estructuras porosas similares a la matriz extracelular (MEC), favoreciendo que sirvan de soporte para la proliferación de determinadas células a fin de dirigir la regeneración del tejido lesionado.

La MEC de tejidos de mamífero puede aislarse, descelularizarse y después de un procesamiento adicional, puede formar un hidrogel. Las características estructurales como la biodegradabilidad, el contenido de agua, la interconectividad y la biocompatibilidad hacen del hidrogel de matriz extracelular ósea un material candidato para la ingeniería de tejidos.

La biocompatibilidad es la característica esencial que deben poseer los biomateriales para ser empleados en el campo de la biomedicina, para que un biomaterial se considere biocompatible, el organismo no debe desencadenar una respuesta inmunológica contra el biomaterial, aceptándolo como propio y restableciendo la función previamente perdida.

El objetivo de evaluar la biocompatibilidad de un hidrogel de matriz extracelular ósea es determinar los efectos tóxicos para el cuerpo. Por lo tanto, se debe evaluar un biomaterial para determinar las respuestas biológicas que podrían causar daños o efectos secundarios no deseados al hospedero.



## 2 MARCO TEÓRICO

Un problema de salud importante a nivel mundial es la pérdida de tejidos, estas afecciones pueden deberse a distintos factores, como traumatismos, enfermedades cirugías o malformaciones congénitas. El tratamiento de estas lesiones puede volverse un proceso complicado, prolongado y costoso, afectando la calidad de vida de los pacientes.

El tejido óseo es uno de los más afectados, el hueso es, de hecho, el segundo tejido más trasplantado después de la sangre. Varios países están experimentando actualmente una demanda extremadamente alta de injertos óseos (1).

La incidencia mundial de trastorno y afecciones óseas ha ido en aumento en los últimos años, con más de 2.2 millones de procedimientos de injerto óseo que se realizan anualmente en todo el mundo (2).

Se espera que este número se duplique a nivel mundial debido a una variedad de factores, como las crecientes necesidades de la población mundial, el aumento de esperanza de vida y un mayor acceso a servicios y asistencia de salud avanzados (1).

El tejido óseo a diferencia del tejido cartilaginoso tiene la capacidad de reparar constantemente los daños menores que se producen de forma cotidiana, sin embargo, hay un gran número de situaciones en las cuales el proceso de reparación natural no ocurre. Ejemplo de esto son las fracturas de gran amplitud, malformaciones congénitas, osteonecrosis, intervenciones quirúrgicas, entre otras afecciones (3). Los defectos óseos de tamaño crítico resultado de estos padecimientos impiden que el hueso se regenere y requiera soporte adicional.

Actualmente se aplican distintas terapias para las diversas lesiones óseas. Entre ellas la utilización y sustitutos de injertos óseos. Los defectos óseos se han tratado

tradicionalmente con trasplante de tejido autólogo, alogénico, xenogénico o mediante la implantación de materiales alternativos.

## **2.1 Sustitutos óseos**

Un sustituto óseo es aquel material o tejido utilizados para llenar un defecto óseo después de una cirugía o un trauma, con el objetivo de inducir la regeneración y reparación del tejido óseo dañado (4). El sustituto óseo ideal debe cumplir con ciertas características, como: ser estéril, no tóxico, aceptable inmunológicamente, capaz de inducir la diferenciación de células locales a células formadoras de hueso mientras proporciona un andamio conductor que puede ser reabsorbido gradualmente para formar hueso nuevo (5).

Se distinguen dos tipos de sustitutos óseos, los injertos óseos, que corresponden a fragmentos de hueso natural implantables, y los biomateriales, diseñados y manufacturados a partir de una variedad de materiales (polímeros naturales y sintéticos, cerámicas, compuestos, entre otros) para imitar la naturaleza física y mecánica del tejido nativo (3).

### **2.1.1 Injertos**

Los injertos actúan mediante tres tipos de mecanismos biológicos: osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción. La osteogénesis es la capacidad de generar hueso a partir de las células contenidas en el injerto y por lo tanto depende específicamente de la supervivencia de las células trasplantadas. La osteoconducción es la capacidad de servir como molde para la incorporación de capilares y células osteoprogenitoras de la zona receptora. La osteoinducción es la capacidad de reclutar células mesenquimales del entorno del implante y luego diferenciarlas en osteoblastos por medio de distintos factores de crecimiento (TGF-B, BMPs, IGF). Los injertos se clasifican según su procedencia en:

Injerto autólogo (autógeno) es el estándar de oro del injerto óseo. Corresponde al uso de hueso tomado de la misma persona que recibe el injerto. Se puede extraer un injerto óseo de huesos no esenciales: la cresta iliaca, generalmente en cirugía dental y maxilofacial, de la sínfisis o la rama mandibulares anterior. El hueso autógeno es el más utilizado, presenta porcentajes altos de éxito debido al menor riesgo de falla del injerto por ser derivado del propio cuerpo del individuo. Las desventajas de los injertos óseos autólogos incluyen la necesidad de una incisión adicional, lo que puede provocar complicaciones como lesiones en el sitio donante, morbilidad, deformidad, cicatrices y dolor postoperatorio por tiempo prolongado (6).

Aloinjerto, este hueso es obtenido de un cadáver o de un donador, es procesado para luego ser trasplantado a un paciente. Este tipo de injerto es acelular y presenta resultados menos positivos (7), ya que su tasa de incorporación es menor debido a la ausencia de células osteoprogenitoras, además de que puede causar una reacción inmunológica.

Los xenoinjertos son fragmentos de hueso extraídos de un donante no humano, usualmente obtenidos de animales (hueso bovino y porcino) o diferentes especies (coral natural) (8). Los xenoinjertos se aplican comúnmente como una matriz calcificada. Tanto los aloinjertos como los xenoinjertos excluyen las complicaciones del sitio del donante (9), sin embargo, presenta una serie de desafíos biológicos que incluyen el riesgo de transmisión de enfermedades (priones y retrovirus), una respuesta inmunológica del tejido del hospedero después de la implantación, falta de células viables y propiedades osteoinductivas reducidas debido a los procesos de fabricación (10).

Otro de los inconvenientes con los injertos antes mencionados es que, en algunas ocasiones, los pacientes, incluso después del trasplante, seguirán siendo tratados con inmunosupresores para prevenir el rechazo del tejido trasplantados por el resto de sus vidas. Esto ha llevado a la conclusión de que estos injertos son solo una solución parcial (11). La forma ideal de eludir estas deficiencias es utilizar las propias células

del paciente o un material biodegradable que pueda promover el crecimiento de células, tejidos vecinos o que sirva como un andamio provisional para que las células se adhieran, proliferen y se diferencien en su interior. Se espera que esta estrategia reduzca el tiempo de espera que conllevan los trasplantes y minimice el riesgo de rechazo del trasplante.

A causa de obstáculos como la transmisión de enfermedades, la morbilidad del sitio donante y la incapacidad que tienen los materiales para remodelarse y reaccionar ante condiciones fisiológicas, ninguno de los tratamientos convencionales ha podido reemplazar todas las necesidades a la hora de tratar problemas relacionados con la pérdida o deterioro del tejido óseo; por tanto; se vuelve necesaria la búsqueda de soluciones alternativas.

Para hacer frente a estas dificultades surge la Ingeniería Tisular como una opción para restaurar mantener o mejorar la función de un órgano o tejido, mediante la manipulación de matrices tridimensionales (scaffolds), células y factores de crecimiento.

## **2.2 Ingeniería Tisular**

La ingeniería tisular ha surgido como una alternativa prometedora y como un campo de investigación interdisciplinario que combina los principios de la ingeniería de materiales con las ciencias biológicas para desarrollar sustitutos que reparen, mantengan o mejoren la función biológica de los tejidos.

Este nuevo campo se fundamenta en la comprensión de la formación y regeneración de los tejidos, y tiene como objetivo inducir la formación de nuevos tejidos funcionales, en lugar de solamente implantar nuevas piezas de repuesto (12).

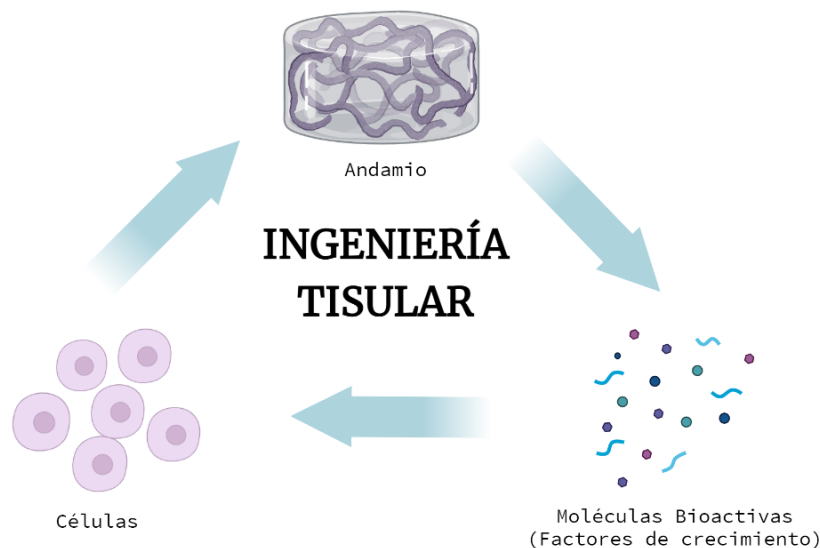
La finalidad de la ingeniería tisular es restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos que están defectuosos o se han perdido en diferentes condiciones patológicas, ya sea mediante el desarrollo de sustitutos biológicos (13).

La ingeniería de tejidos se basa en el uso de biomateriales para mejorar los procesos de curación y regeneración, sus aplicaciones médicas incluyen el diseño de tejidos y órganos artificiales.

La ingeniería tisular se basa en la “triada de la ingeniería tisular” que se muestra en la figura 1 cuyos componentes son:

- Células, esenciales para la formación de nuevo tejido de regeneración.
- Factores de crecimiento, que contribuyen a la multiplicación y diferenciación de las células
- Biomateriales, llamados también *scaffolds*, que sirven de soporte para las células en las primeras etapas de regeneración, promueven la proliferación y diferenciación celular.

Estos tres elementos deben actuar de manera orquestada para lograr la meta central de este novedoso campo.



**Figura 1. Triada de la ingeniería tisular.** Los andamios, células y factores bioactivos se combinan y coordinan para regenerar el tejido deseado.

### 2.2.1 Células empleadas en andamios

La ingeniería tisular aplica la siembra de células en andamios que, al ser porosos, proporcionan un entorno tridimensional que facilita la proliferación celular, vascularización y regeneración(15).

Las células ideales para la aplicación en este campo deben ser fáciles de obtener y expandir, conservar el fenotipo, mantener su función, ser multipotenciales para diferenciarse a una variedad de células especializadas específicas de tejidos u órganos, no deben generar respuestas inmunológicas (16) y deben tener un patrón de expresión de proteínas similar al tejido que se va a regenerar (12).

Las células que cumplen satisfactoriamente con estos requisitos son las células madre mesenquimales (MSC), ya que tienen capacidad para aislarse y expandirse extensivamente fácilmente mediante diversas técnicas de cultivo de tejidos y a su versatilidad para replicarse como células indiferenciadas que tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes linajes celulares, que dan origen al hueso, cartílago, grada,

piel, tendón y músculo. Por esta razón las MSC son una fuente de células atractiva para la aplicación de ingeniería de tejidos (17).

Posteriormente, estas células son sembradas en una matriz tridimensional y son sometidas a un estímulo químico ejercido por las moléculas bioactivas que provocan respuestas celulares específicas, con la finalidad de acelerar la producción de un implante eficiente. La diferenciación a un linaje deseado puede lograrse mediante medios condicionados con factores de crecimiento u otras moléculas específicas para este fin.

### **2.2.2 Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento son moléculas de señalización que pueden actuar como mitógenos promoviendo la proliferación de ciertos tipos de células o como morfógenos induciendo el cambio en el fenotipo de las células blanco.

Los factores de crecimiento más relacionados con la osteogénesis son: las proteínas morfogénicas óseas ("Bone Morphogenic Protein" BMP), el factor insulinoide de crecimiento ("Insulin-like Growth Factor" beta TGF-  $\beta$ ), el factor de crecimiento derivado de plaquetas ("Platelet Derived Growth Factor PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor FGF) (18). Estos factores son los más comunes y son aquellos que se han propuesto para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo (19).

Por último, se necesita de un dispositivo que proporcione a las células el apoyo necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas y las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica y, además, defina la arquitectura del tejido (20). Estos dispositivos son matrices tridimensionales que se conocen como biomateriales.

### **2.2.3 Biomateriales**

Los biomateriales, también conocidos como andamios (scaffolds), matrices o construcciones juegan un papel fundamental en la ingeniería de tejidos al actuar como marcos artificiales (21). La función de estos andamios es dirigir el crecimiento de las células sembradas dentro de la estructura porosa del andamio o de células que migran desde el tejido circundante.

Los andamios deben estar diseñados para soportar la adhesión, proliferación y diferenciación celular, además de soportar las demandas del sitio lesionado durante todo el proceso de regeneración, esto dependerá de la zona a regenerar y de las propiedades del material (22).

Las propiedades físicas, propiedades biológicas, la estructura y la composición química dependerán del material con el que son fabricados. En la fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos se utilizan tres grupos de biomateriales, a saber, metales, cerámicas, polímeros sintéticos y polímeros naturales.

#### **2.2.3.1 Metálicos**

Los biomateriales metálicos son ampliamente utilizados para aplicaciones clínicas debido a una excelente combinación de propiedades mecánicas, durabilidad y su capacidad para promover el crecimiento óseo (23). A la fecha, los tres biomateriales metálicos más utilizados son las aleaciones de cobalto-cromo (Co-Cr) y aleaciones de titanio (Ti), y los aceros inoxidables (SS)

El titanio exhibe biocompatibilidad junto con resistencia mecánica y buenas resistencias a la corrosión (24). Los metales pueden proporcionar una combinación de las propiedades requeridas para la aplicación biomédica, incluido el alto límite de ductilidad y fatiga, buena corrosión y resistencia al desgaste, comparados con las



cerámicas y los polímeros (25). Sin embargo, aún carecen de biofuncionalidades satisfactorias para ciertas aplicaciones, tales como compatibilidad de sangre para dispositivos de contacto en sangre, conductividad ósea en aplicaciones ortopédicas, además, estos implantes al no ser reabsorbibles no pueden cambiar su forma a través del modelado y remodelado óseo para lograr adaptarse a las nuevas necesidades del hueso en esa zona.

#### 2.2.3.2 Cerámicas

Una cerámica está constituida por un material inorgánico no metálico que puede poseer una estructura cristalina. Las cerámicas suelen tener una alta resistencia a la compresión y baja ductilidad, lo que significa que proporcionan una alta resistencia a la deformación pero que tienden a fallar debido a su naturaleza frágil. Ejemplos de cerámicas son: los fosfatos de calcio, los sulfatos de calcio, hidroxiapatita y el vidrio bioactivo. Estas sustancias, especialmente los fosfatos de calcio son candidatos ideales para usar como matrices porque el componente inorgánico del hueso está compuesto por la hidroxiapatita de calcio. Los fosfatos de calcio también tienen potencial como vehículos de suministro de fármacos y/o factores como resultado de las altas afinidades de unión entre las cerámicas y las proteínas (26).

Las cerámicas bioactivas como hidroxiapatita y fosfato tricálcico reaccionan con fluidos fisiológicos y a través de la actividad celular forman enlaces tenaces con la ingeniería de tejidos duros y en algunos casos tejidos blandos. Sin embargo, su biocompatibilidad y biodegradabilidad son a menudo insuficientes, lo que limita su uso potencial en el aspecto clínico (13). Podemos superar estos problemas mezclando polímeros sintéticos y naturales o utilizando compuestos que mejoren las propiedades del andamio y, por lo tanto, permitan una degradación controlada y mejoren la biocompatibilidad en aplicaciones de ingeniería de tejidos (27). La combinación de polímeros degradables y partículas bioactivas inorgánicas representan el enfoque en términos de rendimiento mecánico y biológico en tejido duro.

### 2.2.3.3 Polímeros

Disponemos de polímeros naturales como el colágeno, el ácido hialurónico, la fibrina y el quitosano, y de polímeros sintéticos como poli anhídridos compuestos basados en ácido poli láctico y fumarato de polipropileno.

#### 2.2.3.3.1 Polímeros naturales

Los polímeros naturales se benefician de un bajo potencial inmunológico y un posible comportamiento bioactivo. Los polímeros naturales que se han investigado para la ingeniería de tejidos óseos incluyen polímeros que se encuentran naturalmente en los seres humanos; colágeno, fibrina y elastina, así como otros polímeros naturales como quitosano, alginato y ácido hialurónico.

Estos polímeros se pueden utilizar como biomateriales para la administración de células/fármacos. La ventaja de los polímeros naturales incluye su biocompatibilidad, disponibilidad comercial, fácil procesamiento e imitan más de cerca la MEC natural de los tejidos; sin embargo, las limitaciones son la escasez de suministro, el costo y la susceptibilidad a la contaminación cruzada (28).

#### 2.2.3.3.2 Polímeros sintéticos

Los polímeros sintéticos se dividen en gran medida en dos categorías: biodegradables y no biodegradables. Los polímeros biodegradables son poliglicólido, polilactida y su copolímero poli (láctida-co-glicólido), polifosfaceno, polianhídrido, poli (fumarato de propileno), poli (cianoacrilato), policaprolactona, polidioxanona y poliuretanos. Los polímeros no biodegradables incluyen poli (alcohol vinílico), polihidroxietilmetacrilato y poli (N isopropilacrilamida). Las ventajas de este andamio son las propiedades fisicoquímicas y la calidad fácilmente controladas, la ausencia de inmunogenicidad, el procesamiento con varias técnicas y el suministro constante de grandes cantidades.

Algunas de las desventajas de los polímeros sintéticos son: posible respuesta inflamatoria, poca rigidez y resistencia a la compresión y poca adherencia celular (29).

## **2.2.4 Biomateriales poliméricos**

Los polímeros constituyen el grupo más diverso por su variada naturaleza, ya sea por su composición química, su estructura o por su forma de preparación, estos dan lugar a una gran gama de materiales con diferentes propiedades. Los diseños típicos de andamios polímeros incluyen laminas o películas, espumas, soluciones, mallas, esponjas, matriz 3D, matriz de nano fibras, microesferas porosas e hidrogeles. Estos diseños se eligen porque promueven una distribución celular uniforme, la difusión de nutrientes y el crecimiento de comunidades celulares organizadas

### **2.2.4.1 Esponjas**

Se han utilizado andamios porosos de esponja en aplicaciones de ingeniería de tejidos, especialmente para el crecimiento del tejido del huésped, el recrecimiento óseo o la vascularización de órganos (30). Su red porosa simula la arquitectura de la MEC permitiendo que las células interactúen de manera efectiva con su entorno. Aunque las esponjas son mecánicamente más estables en comparación con las estructuras de malla, su uso sigue siendo limitado debido a los espacios abiertos presentes en todo el andamio. Un enfoque de andamio polimérico de esponja tiene varias ventajas potenciales para líneas celulares proliferantes o adherentes tales como: proporcionar una superficie física sobre la cual las células pueden colocar su propia MEC, inhibir el crecimiento celular de células adherentes inhibidas por contacto, proporcionan un mejor transporte de nutrientes al centro del dispositivo a través de la red de canales de interconexión porosa. Las esponjas pueden controlarse para formar arquitecturas de poros orientadas o aleatorias (13).

Los polímeros sintéticos biodegradables como PLLA (Poli- (ácido L-láctico) , PGA (poliglicólido), PLGA (Poli (l-láctida-co-glicólido) (31), PCL (Poli ( $\epsilon$ -caprolactona),

PDLLA (poli (DL-lactida) , PEE (Poli (éter éster) a base de PEO (poli (óxido de etileno) y PBT (tereftalato de poli butileno) se utilizan como materiales de andamiaje poroso (32)

#### 2.2.4.2 Nanofibras

El desarrollo de nanofibras ha mejorado el alcance de la fabricación de andamios que potencialmente pueden imitar la arquitectura del tejido humano natural a escala nanométrica. La alta relación de área superficial a volumen de las nanofibras combinada con su estructura microporosa favorece la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular, todas las cuales son propiedades muy deseadas para aplicación de ingeniería de tejidos (33). La mayoría de las nanofibras poliméricas no poseen ningún grupo funcional específico y deben funcionalizarse específicamente para aplicaciones exitosas (34).

#### 2.2.4.3 Microesferas

Los andamios de microesferas son generalmente una matriz polimérica que se utiliza para la encapsulación de fármacos para la liberación de fármacos a una velocidad relativamente lenta durante un tiempo prolongado. Los andamios de microesferas tienen un control de extensión espacial y duración temporal que proporciona los gradientes de rigidez para la ingeniería de tejidos interfaciales (35). Una ventaja de la estructura de microesferas sinterizadas es su interconectividad de poros y el tamaño de poro deseable (32).

#### 2.2.4.4 Matrices

Las matrices de tejido acelular pueden prepararse mediante la fabricación de andamios artificiales o mediante la eliminación de componentes celulares de los tejidos mediante manipulación mecánica y química para producir matrices ricas en colágeno (13). Estas matrices se degradan lentamente durante la implantación y generalmente

son reemplazadas por las proteínas MEC secretadas por las células. El objetivo final de cualquier protocolo de descelularización es eliminar todo el material células sin afectar negativamente la composición, la integridad mecánica y la eventual actividad biológica de la MEC restante. El andamio biológico descelularizado se introdujo para obtener un andamio de matriz fisiológico que se asemeje al de los vasos sanguíneos nativos (36). Se ha demostrado que las matrices de tejido acelular favorecen el crecimiento celular hacia el interior y la regeneración de los tejidos sin evidencia de rechazo inmunogénico (37).

Aunque se han desarrollado y mejorado varios andamios de polímeros biodegradables sintéticos imitando estructuras biológicas, en comparación con otros andamios, los andamios acelulares tienen las siguientes ventajas:

Conservan su estructura anatómica correcta incluso después del proceso de descelularización. Retienen la arquitectura de la MEC nativa y poseen los ligandos de adhesión celular. El proceso de descelularización reduce considerablemente las respuestas inmunológicas al eliminar completamente los componentes celulares.

El proceso de descelularización facilita propiedades biomecánicas similares a las de los tejidos nativos que son fundamentales para la funcionalidad a largo plazo de los injertos.

La ventaja obvia de este andamio es que está compuesto de proteínas de la MEC que se encuentran típicamente en el cuerpo, tiene una arquitectura tridimensional muy similar a la de la original, lo que confiere propiedades mecánicas y físicas apropiadas, lo cual es esencial para identificar y predecir entornos celulares óptimos con el fin de desarrollar andamios para su implantación (13).

El recubrimiento de polímero de un armazón acelular derivado de tejido puede mejorar la estabilidad mecánica y mejorar la hemocompatibilidad de la matriz de proteína. La ingeniería de tejidos ha introducido el uso de materiales biológicos / poliméricos como matrices de inicio. Dichos híbridos pueden ser estructuras complejas, fabricadas a partir de tejidos descelularizados y recubiertos por inmersión con un polímero biodegradable (38).

#### 2.2.4.5 Hidrogeles

En ingeniería tisular, los hidrogeles se encuentran entre las categorías de andamios para guiar el crecimiento óseo más empleados y estudiados.

Los hidrogeles son polímeros hidrofílicos en red, típicamente formados por entrecruzamiento de cadenas, con capacidad de absorber grandes cantidades de agua y otros fluidos. Los hidrogeles compuestos de macromoléculas de origen natural tienen ventajas potenciales de biocompatibilidad, degradabilidad controlada por células e interacción celular intrínseca. Sus múltiples cualidades como aumentar su tamaño en medio acuoso y responder a estímulos como el cambio de pH o temperatura han hecho que sean objetos de estudio y en los últimos años se hayan desarrollado diversos tipos de hidrogeles (39). Los hidrogeles están hechos de polímeros sintéticos o naturales, que se reticulan mediante enlaces covalentes o no covalentes.

Los hidrogeles utilizados en la reparación y regeneración ósea pueden estar hechos a partir de polímeros sintéticos, como el polietilenglicol (PEG), el alcohol polivinílico (PVA), la poliacrilamida (PAM), el poliácido láctico y sus copolímeros, etc. (40). A diferencia de los materiales naturales, los polímeros sintéticos tienen unidades estructurales básicas, por lo que las propiedades de los polímeros (como la porosidad, el tiempo de degradación y las propiedades mecánicas) se pueden ajustar para aplicaciones específicas. Los polímeros sintéticos tienen fuentes de material confiables y una larga vida útil, por lo que se pueden producir en grandes cantidades sin riesgo de inmunogenicidad (41). Los hidrogeles hechos de polímeros sintéticos son portadores prometedores para administrar proteínas activas, factores de crecimiento y fármacos al tejido óseo. También, permiten un mejor control sobre las propiedades físicas, como la densidad de entrelazado, la resistencia mecánica y la adaptación mejorada de las respuestas biológicas (42).

Aunque los materiales sintéticos tienen las ventajas anteriores, su éxito está limitado por su propia actividad biológica inherentemente pobre, subproductos ácidos y otras

deficiencias. Para mejorar las propiedades integrales de estos hidrogeles, se pueden conjugar los materiales sintéticos con productos biológicos y entidades químicas (43).

Los hidrogeles también pueden sintetizarse a partir de materiales naturales, incluidas proteínas naturales (fibrina, fibroína, colágeno y gelatina) y polisacáridos (quitosano, hialuronano y alginato).

Los polímeros naturales son componentes o son similares a la MEC natural, proporcionan un microambiente apropiado similar a la MEC, facilitando así la migración adhesión, proliferación y diferenciación de condrocitos y células osteoprogenitoras a osteoblastos, además de entregar eficientemente nutrientes y factores de crecimiento para promover la adhesión celular, la proliferación y la regeneración de nuevos tejidos (44). Los polímeros naturales ofrecen la ventaja de que pueden acercarse más a la imitación de la MEC, pero tienen la dificultad de procesar el material en las formas requeridas mientras se mantiene la función biológica. De hecho, para obtener la estructura y todos los beneficios de la MEC, algunos investigadores han logrado aislar y descelularizarse la matriz extracelular (MEC) de tejidos de mamíferos para utilizarlos como un andamio biológico (45).

#### 2.2.4.5.1 Matriz Extracelular

Los biomateriales basados en MEC son derivados de tejidos de MEC descelularizados (dECM) y se han explorado ampliamente para la regeneración tisular in situ debido al hecho de que proporcionan un entorno semejante al del tejido ECM nativo, especialmente en lo que respecta al comportamiento celular (46).

La MEC descelularizada es naturalmente el andamio más cercano a la naturaleza, preservando sus características únicas de diseño micro y macroestructural, así como su compleja composición (47).

La composición y la ultraestructura de la MEC son específicas del tejido, pero generalmente consisten en una mezcla compleja de componentes estructurales (colágeno, laminina) y factores de crecimiento (48).

Los hidrogeles se pueden preparar a partir de MEC solubilizada y se ha demostrado que se pueden administrar mediante métodos mínimamente invasivos y cambian favorablemente la respuesta predeterminada a la lesión tisular hacia un resultado constructivo y funcional (49).

La matriz descelularizada de vejiga urinaria, submucosa del intestino delgado (49), y recientemente de tejido óseo bovino (50), han sido utilizados como tejido de origen para la formación de hidrogeles basados en matriz extracelular.

#### 2.2.4.5.2 Hidrogel de matriz extracelular ósea

El uso de matriz ósea desmineralizada (DBM) como sustituto del injerto óseo osteoconductor se ha documentado en estudios anteriores, aunque con un éxito variable, con diferencias en la preparación, los métodos de procesamiento y la edad del donante que influyen en las propiedades y el éxito clínico de DBM. Para mejorar las propiedades, la DBM se somete a un riguroso proceso de descelularización para garantizar la eliminación total de cualquier resto de células o residuos celulares, que se sabe son perjudiciales en los procesos de remodelación de tejidos. Posterior a la descelularización, se realiza una técnica de digestión y solubilización, para finalmente pasar por un proceso de gelificación, formándose así el hidrogel. Por lo tanto, el material producido ahora presenta distintas propiedades estructurales, mecánicas y biológicas.

Existen múltiples opciones de biomateriales para aplicación en ingeniería de tejidos, estos juegan un papel crítico ya que deben proporcionar un sustrato adecuado para la unión, proliferación, la diferenciación y migración celular, así como también facilitar el transporte de nutrientes, desechos y factores de señalización biológica para permitir la



supervivencia celular. El andamio ideal para aplicación en ingeniería de tejidos óseos debe cumplir con ciertos requisitos, los siguientes se han definido como propiedades esenciales de un andamio:

- Biocompatibilidad. Que permita la integración adecuada al tejido hospedero sin presentar efectos genotóxicos o citotóxicos, cause una respuesta inmunológica o inflamatoria mínima.
- Porosidad. Ser una estructura altamente porosa y bien interconectada para permitir la difusión de nutrientes y la siembra de células.
- Estructura física. Volumen y forma que apoye la adhesión y proliferación celular, facilitando el contacto célula-célula y la migración celular.
- Propiedades mecánicas. Suficientes para proteger a las células de las fuerzas mecánicas sin inhibir las señales biomecánicas.
- Biodegradabilidad. Para la fabricación de matrices se deben utilizar materiales que tengan tasas de resorción iguales a las de formación ósea, para que, cuando la lesión este totalmente regenerada, la matriz tridimensional se haya degradado totalmente.
- Osteoinductividad. Proceso por el cual las células madre y células osteoprogenitoras se reclutan en el sitio de regeneración ósea y son estimuladas para diferenciarse hacia la línea osteogénica. (12,51,52,28)

El hidrogel de matriz extracelular ósea posee la mayoría de estas propiedades, lo que vuelve al hidrogel un biomaterial ideal para su uso en ingeniería de tejidos óseos, sin embargo, el principal requisito con el que debe cumplir un biomaterial y comprobarse es el de ser biocompatible, este es un requisito clave, pues el biomaterial entra en contacto directo con tejido, y es esencial que no desencadene una respuesta inmunológica, para que sea aceptado como propio y ayude a restablecer la función previamente perdida.

### **2.2.5 Biocompatibilidad**

La biocompatibilidad es la característica esencial que deben poseer los biomateriales para ser empleados en el campo de la ingeniería de tejidos, para que un biomaterial se considere biocompatible, el organismo no debe desencadenar una respuesta inmunológica contra el biomaterial cuando esté en contacto con la zona biológica, aceptándolo como propio y restableciendo la función previamente perdida.

La definición más aceptada de biocompatibilidad se refiere a la propiedad del biomaterial de desarrollar su función con una respuesta favorable del hospedero hacia el mismo, en una aplicación delimitada (53).

La clave para comprender la biocompatibilidad es comprender que mecanismos químicos, bioquímicos, fisiológicos, físicos u otros se activan por el contacto del biomaterial con las células del cuerpo y también para comprender las consecuencias de estas interacciones (54).

El objetivo general de un andamio biocompatible es influir directamente en las células, apoyar la señalización celular y degradarse de una manera controlable y no toxica. La estructura 3D y el tamaño de los poros de un andamio deben coincidir con los de las células diana y es fundamental para proporcionar suficiente espacio para que las células migren y para que se produzca la vascularización (55). Además, los poros deben ser lo suficientemente grandes para permitir que los nutrientes, metabolitos y desechos se difundan a través del andamio para que las células sigan siendo viables en las profundidades del andamio (56). El tamaño de los poros tiene una influencia directa en como las células crecen y proliferan en el material y debe estar determinado por el tipo de tejido que se está diseñando y los tipos de células que incorporara (57).

Una vez que las células han poblado el andamio y han comenzado a producir su propia MEC, el hidrogel debería degradarse en subproductos biocompatibles que pueden excretarse fácilmente del cuerpo (58). El proceso de degradación no debe incitar una

respuesta inmunológica o inflamatoria del cuerpo. Si los productos de degradación son proinflamatorios, el sistema inmunológico del huésped responderá con una exagerada cantidad de macrófagos y células gigantes de cuerpos extraños que pueden comprometer la función prevista del material (59).

Clásicamente, la biocompatibilidad de un biomaterial implantado se ha descrito en términos de la reacción inflamatoria al material, la respuesta inflamatoria en sí, es una serie de reacciones complejas que involucran varios tipos de células, entre ellas, una de las células más importante en la respuesta inmunológica, el macrófago.

#### 2.2.5.1 Líneas celulares

Se ha recomendado el uso de líneas celulares similares a osteoblastos y macrófagos para evaluar la biocompatibilidad de materiales que pueden utilizarse en dispositivos médicos (60).

##### 2.2.5.1.1 Macrófagos

La mayoría de los materiales que son implantados en los tejidos vivos pueden desencadenar una respuesta inflamatoria del hospedero, generalmente conocida como respuesta a cuerpo extraño.

La inflamación es usualmente una respuesta altamente coordinada que involucra distintas células del sistema inmunológico, principalmente macrófagos. Los macrófagos son reclutados rápidamente al sitio del implante para actuar como primera línea de defensa, con el objetivo de fagocitar el cuerpo extraño (61). Los macrófagos están regularmente en reposo, sin embargo, el proceso de interacción con el biomaterial puede activarlos y en respuesta liberar moléculas, las cuales estimulan el proceso de inflamación (62).

Bajo la influencia de citocinas liberadas por una amplia variedad de tipos de células (linfocitos, monocitos, fibroblastos), los macrófagos muestran varias características de activación. Morfológicamente, la célula aumenta de tamaño y de número de gránulos y la membrana plasmática se vuelve más erizada. Los macrófagos activados también aumentan sus funciones biosintéticas y liberan diversos materiales como enzimas lisosomales, interferón, agentes citotóxicos y prostaglandinas.

En las pruebas *in vitro* la cantidad de moléculas inflamatorias liberadas en el medio de cultivo es proporcional a la toxicidad que podrían presentar el material evaluado.

#### 2.2.5.1.2 Células Mesenquimales

Las células madre mesenquimales tienen un gran potencial terapéutico ampliamente informado en la literatura actual. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células de linaje mesenquimatoso y ofrecen las fuentes celulares ideales para la ingeniería de tejidos (63).

La ingeniería de tejido óseo eficaz exige un enfoque multidisciplinario y requiere como mínimo tres componentes críticos: progenitores osteogénicos, factores de formación y andamios osteoinductivos y/o osteoconductores (64). Los osteoprogenitores generalmente se derivan de células madre mesenquimales. Es concebible que las células madre mesenquimales, junto con andamios ideales, mejorarían significativamente la regeneración ósea para reparar defectos óseos (65).

Un andamio óptimo debe proporcionar un entorno favorable para las células, permitiendo que éstas proliferen y se diferencien. Por lo tanto, es ideal, evaluar la citotoxicidad del hidrogel de matriz extracelular ósea en estas células de relevante importancia en la respuesta inflamatoria, y en el proceso de reparación ósea.

Para tener una manipulación clínica adecuada, es necesario realizar estudios de biocompatibilidad, estos permiten evaluar la viabilidad del producto. Es indispensable

el estudio *in vitro* para identificar los potenciales efectos nocivos que pueda tener el biomaterial antes de que se encuentre en contacto con el ser humano. Todas las pruebas de biocompatibilidad de nuevos biomateriales deben realizarse *in vitro* antes que *in vivo* para reducir el uso de modelos animales y los riesgos en los ensayos clínicos (66).

#### 2.2.5.2 Bioensayos de biocompatibilidad

La evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* es necesaria para evaluar las respuestas celulares y moleculares a los distintos materiales recientemente desarrollados. Existen diferentes parámetros experimentales primordiales de biocompatibilidad *in vitro*, la expresión de citocinas, la genotoxicidad, la proliferación celular y en particular de mayor interés la citocompatibilidad (66).

Los ensayos de citotoxicidad que utilizan métodos basados en cultivos celulares son el primer paso para evaluar la biocompatibilidad de un material, se utilizan comúnmente para medir los efectos en las células durante la exposición a sustancias tóxicas en múltiples concentraciones y parámetros de evolución temporal. Los ensayos de citotoxicidad son sensibles, fiables, convenientes y reproducibles a pesar de su falta de especificidad (67).

Además de las investigaciones morfológicas basadas en el examen microscópico de células, las pruebas de viabilidad se basan en la medición de una amplia variedad de funciones celulares. Existen múltiples ensayos para evaluar la citotoxicidad, como el recuento de células, los tintes vitales o los más utilizados, los ensayos basados en bioquímicos (68).

Los ensayos basados en bioquímicos son pruebas menos sujetas a la interpretación de los analistas y podrían usarse de manera más confiable para estudios de dosis/respuesta. El ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se usa ampliamente como una medida de viabilidad celular, ya que el daño de la membrana

celular da como resultado la liberación de esta enzima citosólica y el aumento de su concentración extracelular.

Los métodos basados en formazán son los más utilizados para evaluar la viabilidad y proliferación celular, e incluyen ensayos colorimétricos MTT, MTS, XTT, INT y WST-1 que miden la actividad mitocondrial de las deshidrogenasas en células viables (69).

#### 2.2.5.2.1 Ensayo MTT

El ensayo colorimétrico de bromuro de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (MTT) es la prueba más utilizada para evaluar viabilidad y proliferación celular, es un ensayo simple que se utiliza para identificar efectos intracelulares perjudiciales sobre las mitocondrias y la actividad metabólica, basándose en la capacidad selectiva de células viables para reducir el bromuro de tetrazolio en cristales de formazán purpura, que se puede disolver en un disolvente orgánico y la cantidad se puede determinar de forma semiautomática utilizando un lector de microplacas. Las lecturas de absorbancia estas relacionadas con el número de células, lo que brinda la posibilidad de utilizar el ensayo MTT como ensayo de proliferación para evaluar el crecimiento celular después de la irradiación (70). El grado de formación de cristales de formazán depende de la actividad metabólica intacta (66). La intensidad del color del formazán formado es directamente proporcional al número de células viables. La medición de la absorbancia del formazán a 570 nm permite la evaluación cuantitativa de las células vivas. El material se considera citocompatible si el porcentaje de células viables es igual o superior al 70% (71). Aunque MTT se considera el “estándar de oro” en los estudios de citotoxicidad y los resultados son fáciles de interpretar,(72), la prueba tiene varias limitaciones. Por tanto, las condiciones del cultivo celular pueden afectar el metabolismo y la tasa de reducción de MTT, y la interacción entre el material de prueba y MTT puede modificar los resultados finales (73).

#### 2.2.5.2.2 Ensayo LDH

El ensayo de fuga de LDH se basa en la medición de la actividad lactato deshidrogenasa en el medio extracelular. La pérdida de LDH intracelular y su liberación al medio de cultivo es un indicador de muerte celular irreversible debido al daño de la membrana celular (74).

El ensayo se basa en medir la actividad de LDH para catalizar la reacción:  $\text{NADH} + \text{Piruvato} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{NAD} + \text{Lactato}$ , donde NADH se reduce a -nicotinamida adenina dinucleótido. Dado que el NADH tiene un pico de absorbancia a 340 nm, la tasa de disminución del nivel de NADH se puede medir y usar para determinar la actividad de LDH si la reacción comienza con niveles conocidos de NADH y piruvato y un nivel desconocido de LDH (75).

Los hidrogeles aplicados en el sitio de una herida pueden inducir toxicidad a las células, dependiendo de su concentración, extractos o productos de degradación. Por esto, el comportamiento de los materiales en presencia de células huésped vivas se evalúan *in vitro* a lo largo de su uso. Los materiales que provocan cambios en la morfología celular, adhesión o proliferación, que conducen a su muerte, se consideran tóxicos (76).

Por tanto, es de suma importancia evaluar la biocompatibilidad de un biomaterial antes de su aplicación, es necesario determinar las respuestas biológicas que podrían causar daños o efectos secundarios no deseados al hospedero, y a su vez comprometan el proceso de regeneración.

Las pruebas de biocompatibilidad son una estrategia para evaluar biomateriales de regeneración, en esta estrategia se estudian los procesos fisiopatológicos *in vitro* e *in vivo* mediante selección de células y materiales de acuerdo con las condiciones metabólicas y mecánicas de la zona por reparar.

## 2.3 Antecedentes

La biocompatibilidad es un campo que atrajo por primera vez la atención de los investigadores en la década de 1940 en el contexto de los implantes médicos y sus interacciones beneficiosas con el cuerpo.

En 1987, la biocompatibilidad se definió formalmente como “la capacidad de un biomaterial para funcionar con una respuesta apropiada del huésped en una aplicación específica” (77), fue redefinido 30 años después por Kohane y Langer, siendo “una expresión de la benignidad de la relación entre un material y su entorno biológico (78).

El uso de hidrogeles para la ingeniería de tejidos es relativamente nuevo y solo hay una cantidad modesta de datos sobre sus mecanismos precisos y su desempeño con respecto a la biocompatibilidad (57).

Sawkins y cols., en 2013 realizaron un estudio sobre la formación de un hidrogel de matriz ósea bovina descelularizada (bECM) y desmineralizada (bDBM). Para evaluar proliferación celular de células mPCs (células primarias de calota de ratón), estas fueron cultivadas en la superficie de 3,4,6 y 8 mg de hidrogel de bECM y bDBM, se evaluó proliferación mediante ensayo colorimétrico MTS después de 2 y 3 días. Se observó aumento de proliferación de mPCs en hidrogeles de bECM. El número de células fue significativamente mayor en bECM en comparación con bDBM (50)

En 2014, Smith y cols., desarrollaron un hidrogel de matriz extracelular ósea bovina, analizaron su capacidad de formación de tejido óseo y biocompatibilidad. Para evaluar biocompatibilidad, cultivaron HBMSCs (células del estroma de la medula ósea humana) en hidrogel por 10 días, se llevó a cabo ensayo de tinción Vida/ Muerte. En hidrogel cultivados con HBMSC, la tinción de marcador de viabilidad celular demostró presencia de una población de HBMSCs viables, así como una discreta presencia del marcador de necrosis, lo que indica una muerte celular mínima (79).



Bulman y cols., evaluaron biocompatibilidad de un hidrogel de pululano, un exopolisacarido no inmunogénico estructuralmente flexible con propiedades adhesivas. La citocompatibilidad se evaluó midiendo viabilidad y proliferación de células mesenquimales en contacto con biomaterial. La actividad metabólica de mesenquimales se evaluó mediante ensayo MTS a 1, 3 y 7 días. Observando viabilidad y proliferación mesenquimales se mantuvo hasta siete días (80) .

En 2016, Viswanath y cols. investigaron la capacidad de distintos hidrogeles (entre ellos el hidrogel de matriz ósea bovina) para ser vehículos adecuados para administrar SCAP (células madre mesenquimales derivados de la papila apical humana) y facilitar la regeneración tisular. Fue necesario evaluar viabilidad y proliferación celular. Para viabilidad se cultivaron SCAP en hidrogel de MEC, 2 días después se realizó ensayo vida/muerte. Se obtuvo como resultado un 85% de viabilidad de las SCAP. Para evaluar proliferación celular se cultivaron SCAP en hidrogel de MEC, después de 2, 7 y 14 días la proliferación fue analizada usando un kit Presto Blue, midiendo las intensidades de fluorescencia a 2 horas de adicionado el reactivo. Se observó aumento en proliferación de SCAP a 7 días, teniendo mayor proliferación a 14 días.

Paduano y cols., analizaron los efectos de un hidrogel de bECM (matriz extracelular ósea bovina) sobre la diferenciación osteogénica de DPSC (células madre de la pulpa dental), además se evaluó viabilidad de las DPSC. Las DPSC fueron cultivadas en el hidrogel de bECM y fueron evaluadas mediante el ensayo vida/ muerte a los 3,7, 14 y 21 días. La viabilidad de las DPSC se mantuvo hasta los 21 días, solo hubo unas pocas DPSC que dieron positivo para el homodímero de etidio III, lo que significa un bajo número de células muertas (81).

Huang y cols., desarrollaron un hidrogel de quitosano-colágeno (CS/Col) que adicionaron con hidroxiapatita para evaluar su biocompatibilidad y proliferación celular *in vitro* e *in vivo*. El CS/HA/Col mostró una buena biocompatibilidad con las rBMSCs (células madre de medula ósea de rata). Cuando el CS/HA/Col y las rBMSCs se

inyectaron en el dorso subcutáneo de la rata, las rBMSC sobrevivieron dentro del hidrogel durante 28 días (82).

Recientemente, Zhong y cols., evaluaron la capacidad de entrega *in situ* de BMSC de un hidrogel de matriz extracelular de menisco (mECM), para esto, se evaluó primeramente la viabilidad de las BMSC (células madre de medula ósea) sembradas en el andamio mECM mediante el kit de viabilidad VIDA/MUERTE. Las BMSC presentaban una alta viabilidad celular (>90%), lo que indica que las BMSC se unieron y proliferaron (83).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los defectos óseos son un problema común a nivel mundial, ya sea por traumatismos, patologías o procesos quirúrgicos y afectan considerablemente la calidad de vida de los pacientes. Existen situaciones en las que el proceso de reparación se vuelve lento o incluso nunca llega a repararse.

Se ha investigado una variedad de biomateriales para regeneración ósea. Sin embargo, estos biomateriales todavía presentan requisitos clínicos insatisfactorios. Los hidrogeles han recibido un interés generalizado, por su uso como andamios en ingeniería de tejido óseo, debido a que comparten una estructura similar con la matriz extracelular (MEC) y al ser porosos permiten el trasplante y la proliferación celular.

Aunque sus cualidades parecen prometedoras, hay una propiedad específica que debe poseer el hidrogel para que se considere un biomaterial ideal: la biocompatibilidad.

El éxito de un biomaterial dependerá principalmente de la reacción del cuerpo humano al material, este no deberá desencadenar una respuesta inmunológica para considerarse biocompatible.

Por lo tanto, se debe evaluar la biocompatibilidad del hidrogel de matriz extracelular ósea para determinar las respuestas biológicas que podrían causar daños o efectos secundarios no deseados al hospedero.

## **4 HIPOTESIS**

Los andamios de hidrogel de matriz extracelular ósea bovina y biofuncionalizado con hidroxiapatita son igualmente biocompatibles.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar biocompatibilidad del hidrogel de matriz extracelular ósea bovina y combinado con hidroxiapatita en células mesenquimales y macrófagos

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cultivar células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AD-MSC)
2. Cultivar macrófagos murinos RAW 264.7 (MØ)
3. Evaluar biocompatibilidad de los hidrogeles HMO y HMO+HA en macrófagos.
4. Evaluar biocompatibilidad de los hidrogeles HMO y HMO+HA en células mesenquimales.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Lugar de obtención de la muestra**

Las muestras se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

### **6.2 Tipo de estudio**

*In vitro*, experimental, transversal, prospectivo.

### **6.3 Material Biológico**

#### **6.3.1 Hidrogel de Matriz Extracelular Ósea Bovina (HMO)**

Los hidrogeles empleados fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la UAS

#### **6.3.2 Cultivo de líneas celulares**

Las líneas celulares que fueron utilizadas son líneas primarias de células troncales mesenquimales de tejido adiposo (AD-MSCs) y macrófagos murinos Raw/264.7 ATCC. Éstas se encontraban congeladas en un tanque de nitrógeno líquido en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El protocolo que se siguió es el siguiente: las AD-MSCs y los macrófagos se descongelaron en baño maría a 37°, después se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina – estreptomycin. Para la expansión celular, estas placas se incubaron a 37° en una atmosfera de 5% de CO y 95% de humedad hasta que el cultivo alcanzó un 70% de confluencia. En este punto, las células se

desprendieron de la caja de cultivo con el método químico – enzimático con tripsina-EDTA (0.25%). La viabilidad y las concentraciones celulares se determinaron mediante tinción de exclusión de vitalidad con azul de tripano (0.4%) y con la cámara de Neubauer, respectivamente.

## **6.4 Metodología**

### **6.4.1 Citotoxicidad y proliferación en hidrogeles de MEC**

Se prepararon medios de cultivo condicionados colocando 1 ml del material en 9 ml de medio estándar. Para esto todos los materiales a utilizar se colocaron en la campana de flujo laminar bajo luz UV por 15 min. Se realizó la preparación de 30 ml de medio estándar con antibiótico penicilina – estreptomycin al 1%, y SBF al 10%, se realizaron alícuotas de 9 ml en tubos falcón de 15 ml a los que se les añadió 1 ml de los dos diferentes materiales:

- a. Hidrogel de matriz ósea bovina (HMO)
- b. Hidrogel de matriz ósea bovina con hidroxiapatita (HMO+HA)

Como control. se utilizaron 3 ml de medio estándar.

Los tubos se llevaron al disruptor de tejidos durante 1 minuto a velocidad máxima y después se incubaron toda la noche a 37° C en agitación constante a 250 rpm. Después de transcurrido el tiempo se llevó a centrifugación a 13 000 rpm durante 5 minutos y se rescató el sobrenadante, para después ser filtrado con una membrana de 0.22 µm, lo obtenido fue conservado en refrigeración.

Una vez que todos los medios condicionados fueron preparados se procedió a la colocación en contacto con células mesenquimales y macrófagos.

Se utilizó 1 caja de cultivo para evaluar la citotoxicidad a 24 horas y 3 cajas de cultivo para evaluar proliferación a 24, 48 y 72 horas. En los pocillos fueron colocados 200 µl

de los diferentes medios condicionados; 15,000 células para citotoxicidad y 7,000 para proliferación. El experimento se realizó por triplicado siguiendo el acomodo de la siguiente manera:

**Tabla 1. Distribución de los ensayos de biocompatibilidad.**

ENSAYO CITOTOXCIDAD 24 HORAS (LDH)				
A	HMO	HMO	HMO	CEL. MESENQUIMALES
B	HMO+HA	HMO+HA	HMO+HA	
C	DMEM	DMEM	DMEM	
D	CIT. MAX	CIT.MAX	CIT.MAX	
E	HMO	HMO	HMO	MACRÓFAGOS
F	HMO+HA	HMO+HA	HMO+HA	
G	DMEM	DMEM	DMEM	
H	CIT.MAX	CIT.MAX	CIT.MAX	

ENSAYO PROLIFERACION 24, 48 Y 72 HORAS (MTT)				
A	HMO	HMO	HMO	MACRÓFAGOS
B	HMO+HA	HMO+HA	HMO+HA	
C	DMEM	DMEM	DMEM	
D	HMO	HMO	HMO	CEL. MESENQUIMALES
E	HMO+HA	HMO+HA	HMO+HA	
F	DMEM	DMEM	DMEM	

Se capturaron imágenes de un pozo representativo del triplicado cada 24 horas. Se realizaron los protocolos descritos en el inserto de cada uno de los kits de citotoxicidad (LDH) y proliferación (MTT).



#### 6.4.1.1 Ensayo de citotoxicidad (LDH)

Se empleo un método espectrofotométrico basado en la absorbancia derivada de la formación de un cromóforo a partir de la degradación enzimática de sales de tetrazolio con un lector de placas. Se empleo una longitud de onda de 490 nm para el Kit CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Cytotoxicity Assay (LDH) de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 6.4.1.2 Ensayo de proliferación (MTT)

Se siguió el mismo método descrito para el ensayo de citotoxicidad (LDH). Se empleo una longitud de onda de 570 nm para el Kit CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (LDH) de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.4.2 Análisis estadístico

Para todos los análisis se utilizó el programa IBM SPSS v20.0 (SPSS inc, IL, USA), los resultados se evaluarán mediante un análisis de varianzas (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95%.

## 6.5 Lugar de realización

Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas.

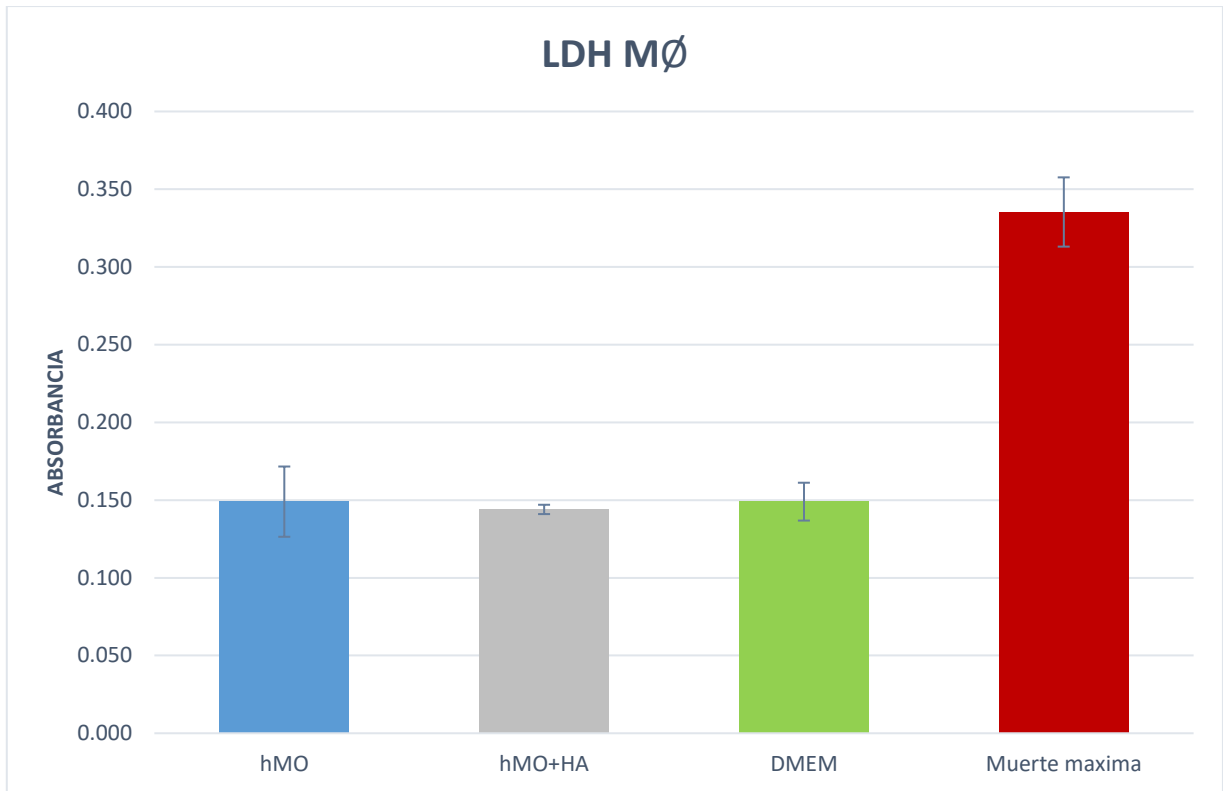
## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Evaluación de citotoxicidad mediante la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)**

El ensayo de lactato deshidrogenasa evalúa daño celular, con liberación de lactato del citosol de las células lisadas en el medio de cultivo, analizando la permeabilidad de la membrana.

#### **7.1.1 Macrófagos**

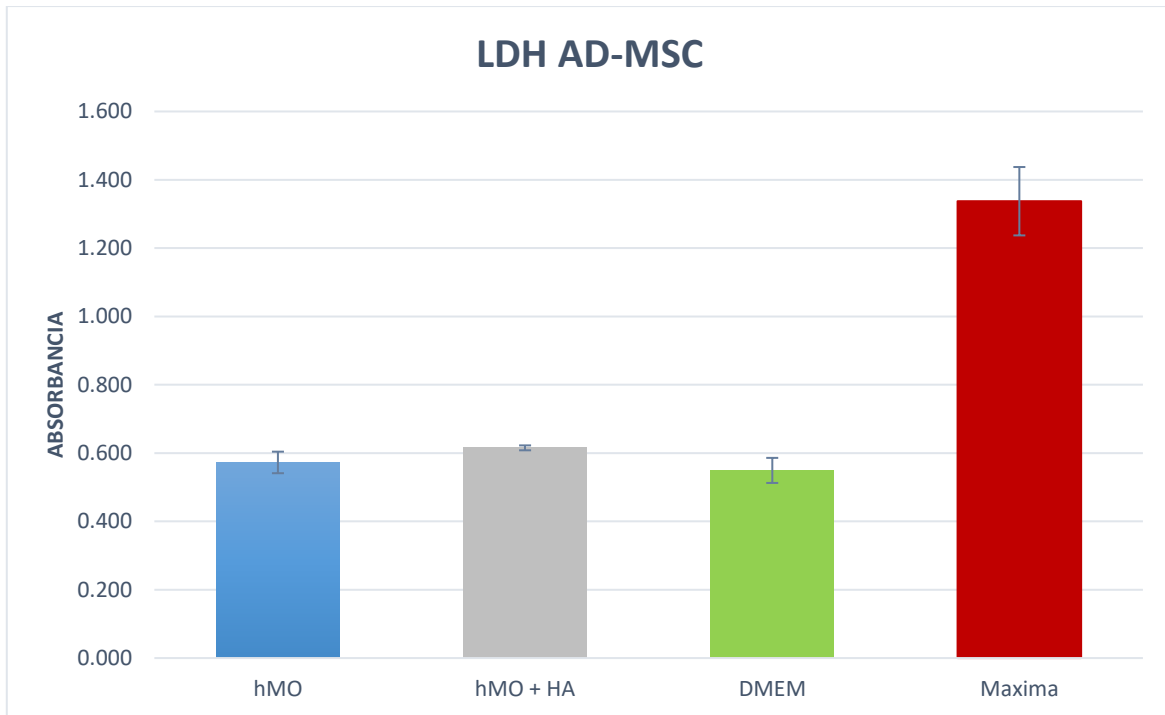
La prueba se realizó en un solo tiempo de exposición a las 24 horas. Ambos hidrogeles en contacto con MØ muestran un nivel de liberación de LDH similar al grupo control (DMEM, lo que indica que estas células se mantuvieron viables durante 24 horas en contacto con hMO y hMO+HA. Las absorbancias nos indican que las membranas celulares de los macrófagos no fueron dañadas, lo que infiere que ambos hidrogeles no tienen efecto citotóxico sobre estas células (Figura 2).



**Figura 2. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos sobre hMO y hMO+HA y grupo control.** Mortalidad celular expresada en liberación de lactato deshidrogenasa en los diferentes hidrogeles y DMEM (muerte basal).

### 7.1.2 Células Mesenquimales

Es notable que no hubo efectos citotóxicos para las AD-MSCs que estuvieron en contacto con ambos hidrogeles, ya que las mediciones de absorbancia de los sobrenadantes en los medios de cultivo fueron similares a las del grupo control. La viabilidad de AD-MSCs se mantuvo durante 24 horas en hMO y hMO+HA (Figura 3).



**Figura 3. Ensayo de citotoxicidad en células mesenquimales sobre hMO y hMO+HA y grupo control.** Mortalidad celular expresada en liberación de lactato deshidrogenasa en los diferentes hidrogeles y DMEM (muerte basal).

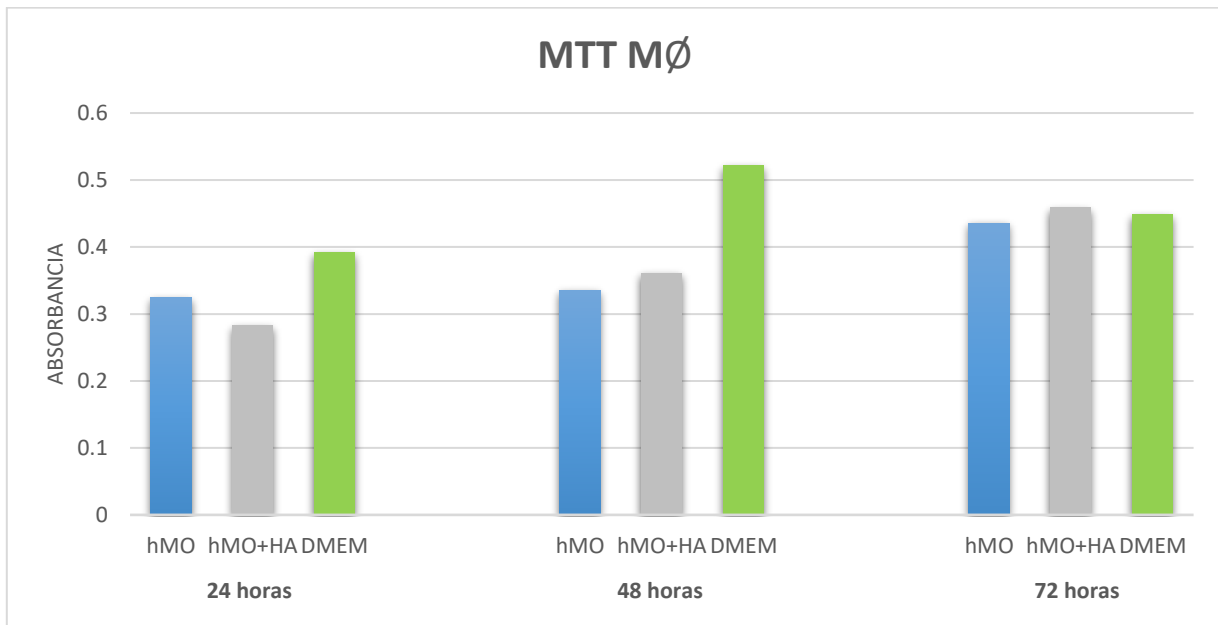
## 7.2 Evaluación de la proliferación celular por reducción del compuesto MTT

Se utilizó el ensayo colorimétrico MTT para analizar proliferación de MØ y AD-MSCs en el hidrogel de matriz extracelular ósea y combinado con hidroxiapatita después de 24, 48 y 72 horas.

### 7.2.1 Macrófagos

Observamos que a las 24 horas, los macrófagos presentaron una mayor tasa de proliferación celular del grupo control seguido de hMO, sin embargo, a las 48 horas aumentó la proliferación de hMO+HA, alcanzando la observada en hMO. Finalmente,

la proliferación a las 72 horas es similar en todos los grupos, indicando que la viabilidad no se ve afectada en contacto con los hidrogeles (Figura 4).

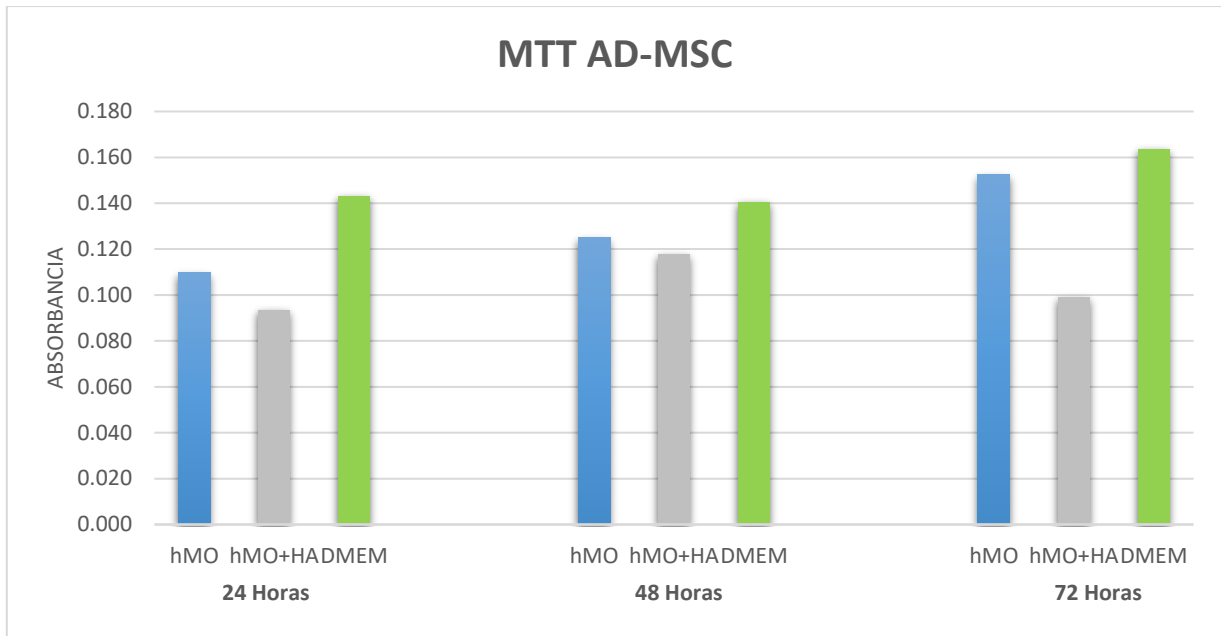


**Figura 4. Ensayo de proliferación de macrófagos sobre hMO y hMO+HA.** Proliferación de MØ en los distintos grupos (hMO, hMO+HA, DMEM) en los tres tiempos de evaluación. Se observa aumento gradual en hMO y hMO+HA.

### 7.2.2 Células mesenquimales

En las primeras 24 horas se observó una proliferación celular mayor en el grupo control, sin embargo, a las 48 horas la proliferación fue similar en todos los grupos de investigación. Mientras que a las 72 horas, la tasa de proliferación fue muy semejante entre el grupo hMO y grupo control.

En general, la proliferación de AD-MSCs sobre los distintos grupos de estudio aumentó gradualmente en los 3 tiempos de evaluación, a excepción de grupo hMO+HA, donde existió una disminución en el lapso de 48 a 72 (tabla 3).



**Figura 5. Ensayo de proliferación de AD-MS sobre hMO y hMO+HA.** Proliferación de AD-MS en los distintos grupos (hMO, hMO+HA, DMEM) en los tres tiempos de evaluación. Se observa aumento gradual en hMO en todos los tiempos, hMO+HA muestra una disminución de proliferación a las 72 horas.

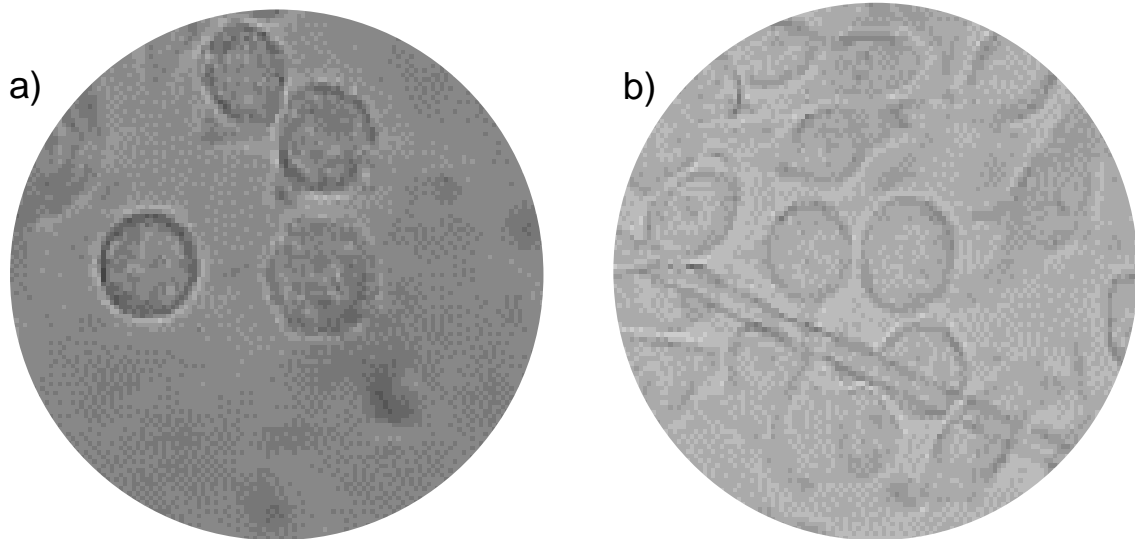
### 7.3 Evaluación morfológica celular

Se tomaron imágenes representativas de MØ y AD-MSCs en contacto con hidrogeles y DMEM, usando un microscopio invertido con contraste de fases y con objetivos de 10x, 25x y 40x durante los distintos tiempos de evaluación. La morfología de ambas células fue evaluada y comparada.

#### 7.3.1 Macrófagos

En los tres grupos observamos una estructura normal, redonda, sin extensiones del citoplasma, ni núcleos celulares de gran tamaño (Figura 6), demostrando que las células no se activaron tras la exposición a hidrogeles. No se observó formación de células multinucleadas. Inclusive, la capacidad de adherencia no se vio afectada, esto

se infiere ya que las células fueron perdiendo su morfología esférica y se tornaron con una morfología más aplanada. Además, no se encontraron diferencias morfológicas de las células tras la exposición a 24, 48 y 72 horas en hMO y hMO+HA, (Figura 7)



**Figura 6. Macrófagos observados con objetivo 40x sobre hMO (a) y hMO+HA (b). Morfología característica de macrófago no activado.**

# Macrófagos

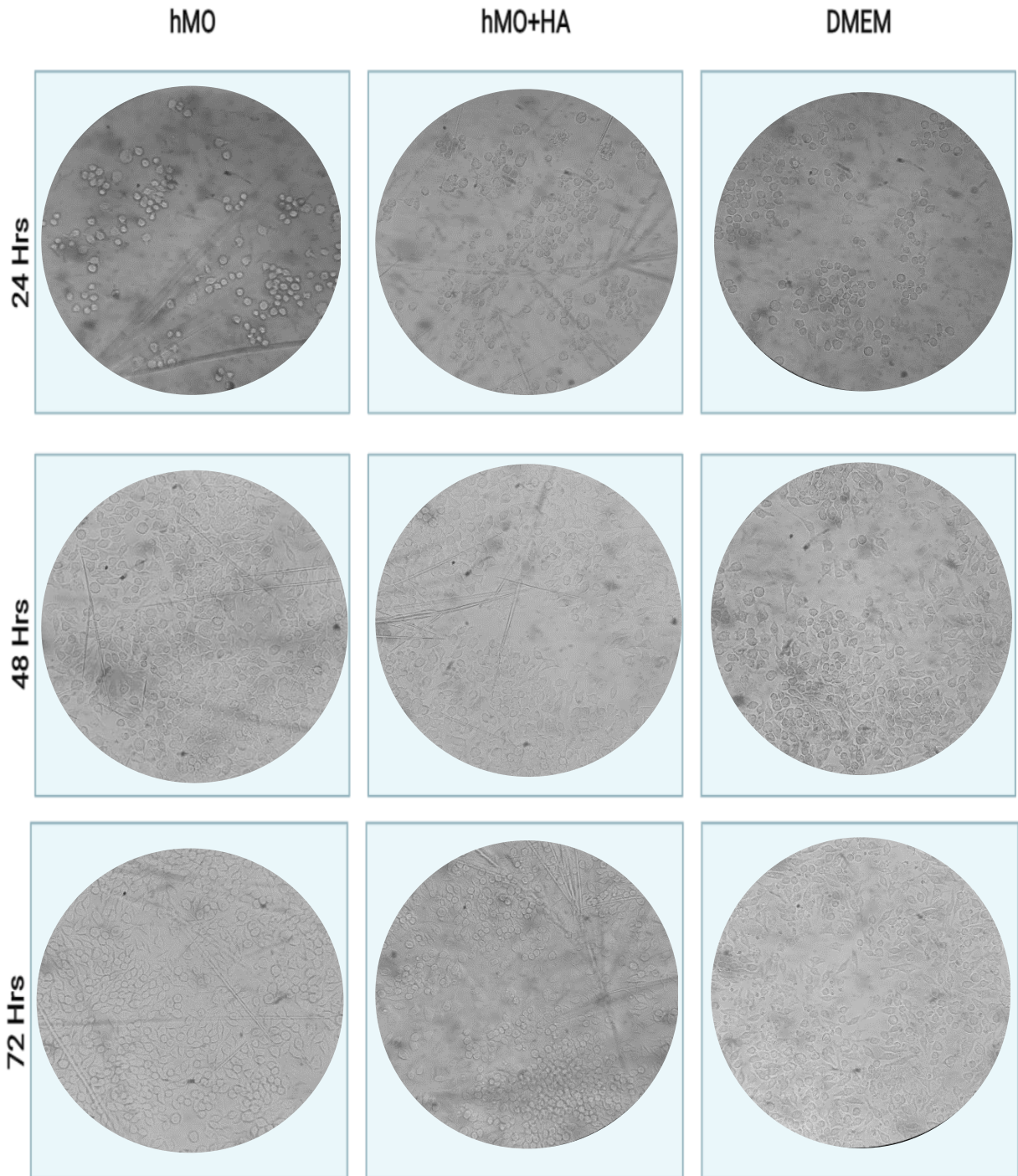
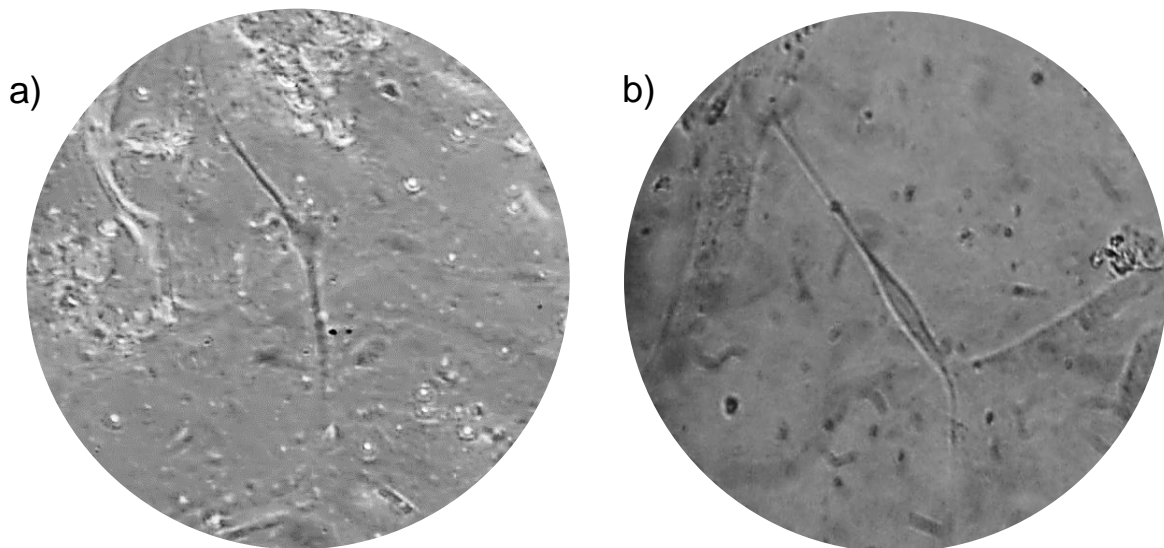


Figura 7. Imágenes representativas tomadas a 40x de MØ sobre hMO, hMO+HA y DMEM en los distintos tiempos de evaluación.



### 7.3.2 Células Mesenquimales

Morfológicamente las AD-MSCs no se vieron afectadas, teniendo morfología similar en todos los tiempos de exposición a los hidrogeles. Las células se adhirieron al plástico, y desplegaron morfología típica, mostrándose planas y alargadas, de forma fibroblastoide como se muestra en la figura 8, además no se observaron vesículas citoplasmáticas, lo que indica que no hubo una activación de estas células.



**Figura 8. Células mesenquimales a 10x sobre hMO (a) y hMO+HA (b).**  
Morfología característica de célula mesenquimal.

Los hidrogeles se mostraron biocompatibles, ya que no alteran morfología celular al estar en contacto con células mesenquimales en lapsos de 24, 48 y 72 horas (figura 9).

## Células Mesenquimales

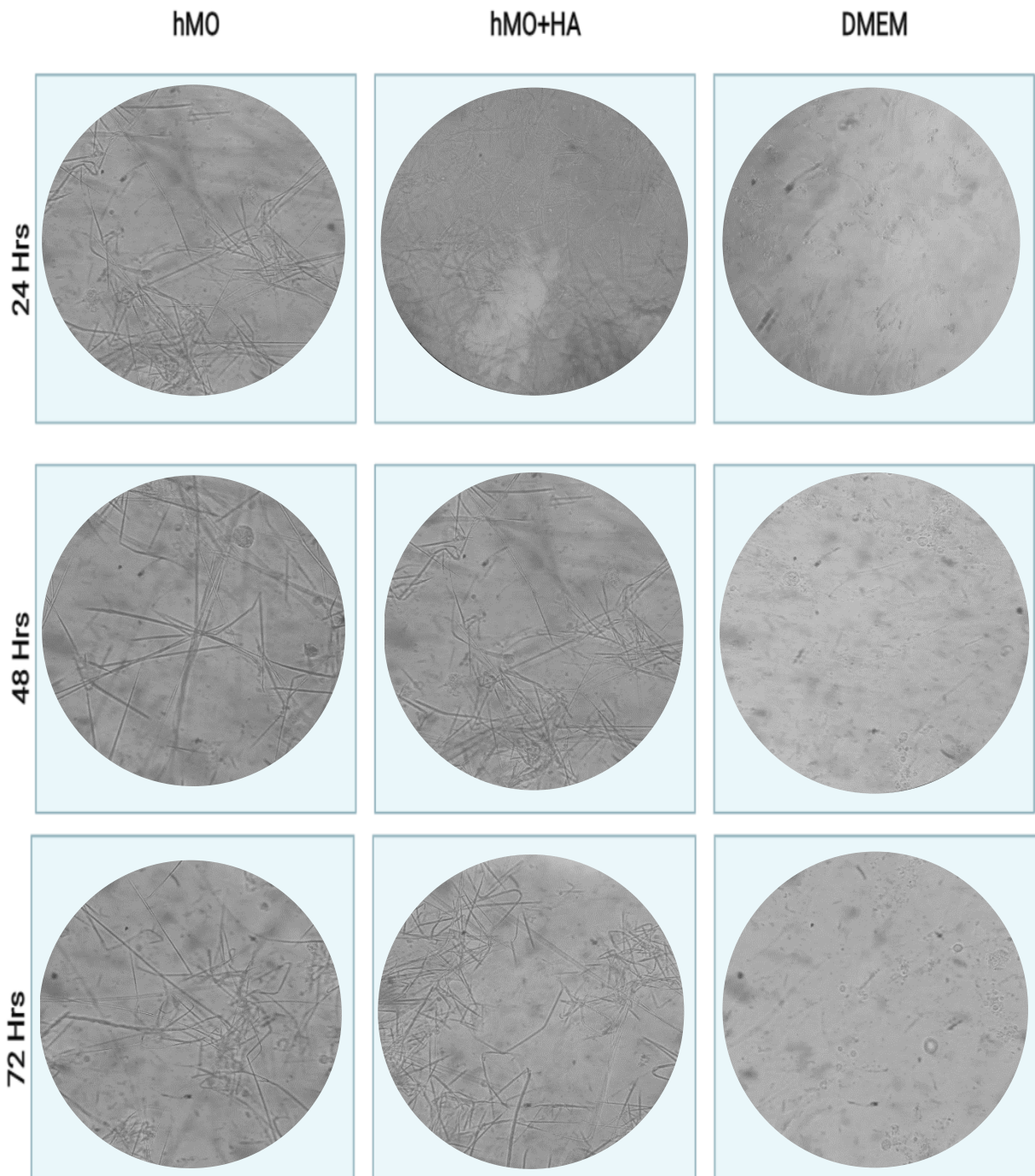


Figura 9. Imágenes representativas de AD-MSCs sobre hMO, hMO+HA y DMEM en los distintos tiempos de evaluación.

## 8 DISCUSIÓN

Viswanath y cols., comprobaron la biocompatibilidad del hidrogel de matriz ósea bovina, en un ensayo vida/muerte con un alto porcentaje de viabilidad de SCAP (84), sus resultados coinciden con los nuestros, ya que observamos que el porcentaje de viabilidad de MSCs y MØ es elevado en nuestros hidrogeles.

Sawkins y cols., reportaron recientemente de un efecto proliferativo aumentado, utilizando un hidrogel de MEC ósea bovina sobre mPCs (50). Estos resultados concuerdan con los nuestros, donde hMO muestra un aumento en la proliferación de MØ y MSCs al aumentar el tiempo de exposición.

Huang y cols., reportaron que un hidrogel de quitosano-colágeno biofuncionalizado con hidroxiapatita fue biocompatible con las rBMSCs (células madre de medula ósea de rata) y podían mantener su actividad proliferativa hasta por 20 días (82), así mismo, en nuestro trabajo se observó citocompatibilidad con MØ y MSCs en hMO biofuncionalizado con HA, además se observó aumento gradual en la proliferación de MØ durante 3 días, curiosamente las MSCs no presentaron el mismo resultado, donde al día 3 se produjo disminución de la proliferación celular.

Nuestros resultados concuerdan con Bulman, quien reporta aumento de proliferación de MSCs cultivadas en hidrogel de pululano. La proliferación de MSCs fue evaluada en ensayo MTS, mostrando proliferación y viabilidad hasta 7 días (80). En el presente trabajo se evaluó la proliferación por 3 días, mostrando que las MSCs en contacto con hMO y hMO+HA mantienen la proliferación durante 3 días.

Contrario a los resultados recabados en este trabajo, Smith y cols., en su estudio obtuvieron una baja tasa de proliferación de HBMSCs que fueron cultivadas en hidrogel de MEC ósea bovina que fue implantado en un defecto óseo en fémur de pollo (79). Esto puede deberse a las condiciones de cultivo en las que se encontraban las HBMSCs, el hidrogel empleado en el estudio de Smith y cols., no fue suplementado

con SFB, a diferencia de nuestro estudio donde los medios condicionados contenían medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y 1% penicilina - estreptomina. Rutinariamente estas células se cultivan en un medio enriquecido con SFB, el cual contiene una gran cantidad de factores no definidos. Sin embargo, las células huésped de pollo que migraron al hidrogel expresaron altos niveles de proliferación.

Escudero y cols., compararon morfología de células mononucleares en contacto con hidrogeles de PEG y PEG- quitosano mostrando estructura celular normal, además encontraron una tasa de viabilidad similar en los diferentes grupos, indicando que no tienen efectos citotóxicos (85). Así mismo, las células implicadas en nuestro estudio (MSC y MØ) que se encontraban en contacto con los hidrogeles se presentaban con una morfología normal, sin alteraciones de su estructura.

## 9 CONCLUSIÓN

Los andamios utilizados para la regeneración de tejido óseo tienen como objetivo proporcionar soporte estructural, crear un entorno adecuado para la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular, para reactivar la actividad funcional del tejido óseo.

Los hidrogeles de matriz extracelular ósea y biofuncionalizado con hidroxiapatita presentan buena biocompatibilidad *in vitro*, sobre macrófagos y células mesenquimales, implicadas en la respuesta inmunológica y regenerativa de los tejidos, no presentando citotoxicidad y promoviendo proliferación celular.

Aun se debe seguir investigando estos hidrogeles *in vivo*, pero gracias a las propiedades evidenciadas en este estudio ya presentan un potencial prometedor para su uso en la ingeniería de tejidos óseos u otras aplicaciones biomédicas.

## **10 PERSPECTIVAS**

Continuar con esta línea de investigación, para que los estudiantes del posgrado de endodoncia continúen desarrollándola para futuras investigaciones de biocompatibilidad y regeneración ósea *in vivo*.

## 11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haugen HJH, Lyngstadaas SP, Rossi F, Giuseppe Perale. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 12]; Available from: <https://scihub.st/10.1111/jcpe.13058>
2. Giannoudis P v, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. [cited 2021 Oct 12]; Available from: [www.elsevier.com/locate/injury](http://www.elsevier.com/locate/injury)
3. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: Material and matrix considerations. In: *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* [Internet]. 2008 [cited 2020 Jul 1]. p. 36–42. Available from: <http://journals.lww.com/00004623-200802001-00008>
4. Jordana F, le Visage C, Weiss P. [Bone Substitutes]. *Medecine sciences : M/S* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jul 2];33(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28120757/>
5. Albarova JG, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R. Estado actual de los injertos óseos. Biología, función, conservación, riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad e incorporación. 2001.
6. Kashirina A, Yao Y, Liu Y, Leng J. Biopolymers as bone substitutes: A review. Vol. 7, *Biomaterials Science*. Royal Society of Chemistry; 2019. p. 3961–83.
7. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. Vol. 2, *Bioactive Materials*. KeAi Communications Co.; 2017. p. 224–47.
8. Dumitrescu A. Chemicals in Surgical Periodontal Therapy. *Chemicals in Surgical Periodontal Therapy* [Internet]. 2011 [cited 2020 Jul 2]; Available from: [www.beck.de](http://www.beck.de)
9. Shibuya N, Jupiter DC. Bone Graft Substitute: Allograft and Xenograft [Internet]. Vol. 32, *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*. W.B. Saunders; 2015 [cited 2020 Jul 2]. p. 21–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25440415/>

10. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. 2011;
11. Atala A, Lanza RP (Robert P, Mikos AG, Nerem RM. Principles of regenerative medicine. :1428.
12. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. [cited 2021 Oct 31]; Available from: [www.mbs-journal.de](http://www.mbs-journal.de)
13. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Sakthi Kumar D. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. International Journal of Polymer Science. 2011;2011.
14. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy RSR. Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems [Internet]. 2012 [cited 2021 Nov 1];29(1):1–63. Available from: [www.begellhouse.com](http://www.begellhouse.com)
15. Katari RS, Peloso A, Orlando G. Tissue Engineering. 2014 [cited 2021 Nov 1]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yasu.2014.05.007>
16. Yang S, Leong K, Du Z, Chua C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. Tissue Engineering [Internet]. 2001 [cited 2021 Nov 1]; Available from: <https://sci-hub.st/10.1089/107632701753337645>
17. JR M, V V, DL K. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. Tissue engineering [Internet]. 2005 May [cited 2021 Nov 1];11(5–6):787–802. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15998219/>
18. H S. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. International journal of oral and maxillofacial surgery [Internet]. 2002 [cited 2021 Nov 4];31(5):469–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12418561/>
19. DE D, DJ M, PW Z. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science (New York, NY) [Internet]. 2009 Jun 26 [cited



- 2021 Nov 4];324(5935):1673–7. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19556500/>
20. Kim B-S, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology* 2000 18:1 [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2021 Nov 4];18(1):2–9. Available from:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s003450050002>
  21. K B, S D, N S. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 Nov 5];104(Pt B):1372–82. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27993655/>
  22. EL S, PH K, DH K. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *Journal of oral rehabilitation* [Internet]. 2009 May [cited 2021 Nov 5];36(5):368–89. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19228277/>
  23. Planell JA, Navarro M, Altankov G, Aparicio C, Engel E, Gil J, et al. Materials Surface Effects on Biological Interactions. In Springer, Dordrecht; 2010 [cited 2020 Jul 2]. p. 233–52. Available from:  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-8790-4\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-8790-4_12)
  24. Simon M, Lagneau C, Moreno J, Lissac M, Dalard F, Grosogeat B. Corrosion resistance and biocompatibility of a new porous surface for titanium implants. *European Journal of Oral Sciences* [Internet]. 2005 Dec [cited 2020 Jul 2];113(6):537–45. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16324146/>
  25. Niinomi M, Nakai M, Hieda J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. Vol. 8, *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd; 2012. p. 3888–903.
  26. Cheng N, Dai J, Cheng X, Li S, Miron RJ, Wu T, et al. Porous CaP/silk composite scaffolds to repair femur defects in an osteoporotic model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [Internet]. 2013 Aug 15 [cited 2020 Jul 2];24(8):1963–75. Available from:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-013-4945-y>

27. Wu F, Wei J, Liu C, O'Neill B, Ngothai Y. Fabrication and properties of porous scaffold of zein/PCL biocomposite for bone tissue engineering. *Composites Part B: Engineering*. 2012 Jul 1;43(5):2192–7.
28. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy RSR. Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* [Internet]. 2012 [cited 2021 Nov 5];29(1):1–63. Available from: [www.begellhouse.com](http://www.begellhouse.com)
29. Cosgriff-Hernandez E, Mikos AG. New biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Pharmaceutical Research*. 2008 Oct;25(10):2345–7.
30. Ferri JM, Jordá J, Montanes N, Fenollar O, Balart R. Manufacturing and characterization of poly(lactic acid) composites with hydroxyapatite: <https://doi.org/10.1177/0892705717729014> [Internet]. 2017 Sep 4 [cited 2021 Nov 6];31(7):865–81. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0892705717729014>
31. D'Souza S, Faraj JA, Giovagnoli S, DeLuca PP. Preparation, Characterization, and In Vivo Evaluation of Olanzapine Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Microspheres. *Journal of Pharmaceutics* [Internet]. 2013 Aug 12 [cited 2021 Nov 6];2013:1–9. Available from: </pmc/articles/PMC4590816/>
32. Borden M, El-Amin SF, Attawia M, Laurencin CT. Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair. *Biomaterials* [Internet]. 2003 Feb [cited 2021 Nov 6];24(4):597–609. Available from: [https://neuro.unboundmedicine.com/medline/citation/12437954/Structural\\_and\\_human\\_cellular\\_assessment\\_of\\_a\\_novel\\_microsphere\\_based\\_tissue\\_engineered\\_scaffold\\_for\\_bone\\_repair\\_](https://neuro.unboundmedicine.com/medline/citation/12437954/Structural_and_human_cellular_assessment_of_a_novel_microsphere_based_tissue_engineered_scaffold_for_bone_repair_)
33. Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Engineering* [Internet]. 2005 Jan [cited 2021 Nov 6];11(1–2):101–9. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/7994589\\_Potential\\_of\\_Nanofiber\\_Matrix\\_as\\_Tissue-Engineering\\_Scaffolds](https://www.researchgate.net/publication/7994589_Potential_of_Nanofiber_Matrix_as_Tissue-Engineering_Scaffolds)

34. Verreck G, Chun I, Rosenblatt J, Peeters J, van Dijck A, Mensch J, et al. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* [Internet]. 2003 Oct 30 [cited 2021 Nov 6];92(3):349–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14568415/>
35. Singh M, Sandhu B, Scurto A, Berkland C, Detamore MS. Microsphere-based scaffolds for cartilage tissue engineering: Using subcritical CO<sub>2</sub> as a sintering agent. *Acta Biomaterialia* [Internet]. [cited 2021 Nov 6];6(1):137–43. Available from: [https://www.academia.edu/50620092/Microsphere\\_based\\_scaffolds\\_for\\_cartilage\\_tissue\\_engineering\\_Using\\_subcritical\\_CO2\\_as\\_a\\_sintering\\_agent](https://www.academia.edu/50620092/Microsphere_based_scaffolds_for_cartilage_tissue_engineering_Using_subcritical_CO2_as_a_sintering_agent)
36. Choe JA, Jana S, Tefft BJ, Hennessy RS, Go J, Morse D, et al. Biomaterial characterization of off-the-shelf decellularized porcine pericardial tissue for use in prosthetic valvular applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 Nov 6];12(7):1608. Available from: </pmc/articles/PMC6055610/>
37. Atala A. Bioengineered Tissues for Urogenital Repair in Children. *Pediatric Research* 2008 63:5 [Internet]. 2008 May [cited 2021 Nov 6];63(5):569–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/pr2008110>
38. Stamm C, Khosravi A, Grabow N, Schmohl K, Treckmann N, Drechsel A, et al. Biomatrix/Polymer Composite Material for Heart Valve Tissue Engineering. *The Annals of Thoracic Surgery* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2021 Nov 6];78(6):2084–93. Available from: <http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003497504009737/fulltext>
39. Mahinroosta M, Jomeh Farsangi Z, Allahverdi A, Shakoori Z. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. Vol. 8, *Materials Today Chemistry*. Elsevier Ltd; 2018. p. 42–55.

40. Sabir MI, Xu X, Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science* [Internet]. 2009 Nov 12 [cited 2020 Jul 2];44(21):5713–24. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-009-3770-7>
41. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A review. *International Journal of Polymer Science*. 2011;19.
42. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. Vol. 24, *Biomaterials*. Elsevier BV; 2003. p. 4337–51.
43. Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation [Internet]. Vol. 60, *Advanced Drug Delivery Reviews*. *Adv Drug Deliv Rev*; 2008 [cited 2020 Jul 2]. p. 215–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17997187/>
44. Zhao W, Jin X, Cong Y, Liu Y, Fu J. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering [Internet]. Vol. 88, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cited 2020 Jul 2]. p. 327–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.3970>
45. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2002;13(5):377–83.
46. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta biomaterialia* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Jan 16];23 Suppl(S):S17–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26235342/>
47. Taylor DA, Sampaio LC, Ferdous Z, Gobin AS, Taite LJ. Decellularized matrices in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia* [Internet]. 2018 Apr 24 [cited 2022 Jan 16];74:74–89. Available from: <https://europepmc.org/article/med/29702289>

48. Mecham RP. Overview of extracellular matrix. Current protocols in cell biology [Internet]. 2012 [cited 2022 Jan 16];Chapter 10(SUPPL.57). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23208544/>
49. Hussey GS, Cramer MC, Badylak SF. Extracellular Matrix Bioscaffolds for Building Gastrointestinal Tissue. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology [Internet]. 2017 [cited 2022 Jan 16];5(1):1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29276748/>
50. Sawkins MJ, Bowen W, Dhadda P, Markides H, Sidney LE, Taylor AJ, et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. Acta Biomaterialia [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Jan 11];9(8):7865–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113002018>
51. Dres GERMAN FALKE AF, Atala A. RECONSTRUCCION DE TEJIDOS Y ORGANOS UTILIZANDO INGENIERIA TISULAR 2000; 98(2) Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular.
52. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. Journal of cellular and molecular medicine [Internet]. 2005 [cited 2021 Nov 9];9(1):72–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15784166/>
53. Williams D. Essential Biomaterials Science. Essential Biomaterials Science. 2014 Jul 17;
54. DF W. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials [Internet]. 2008 Jul [cited 2021 Oct 17];29(20):2941–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440630/>
55. V K, D K. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials [Internet]. 2005 [cited 2021 Oct 17];26(27):5474–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15860204/>
56. BV S, SS K, OZ F, A K, NA P. Hydrogels in regenerative medicine. Advanced materials (Deerfield Beach, Fla) [Internet]. 2009 Sep 4 [cited 2021 Oct 17];21(32–33):3307–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20882499/>

57. Naahidi S, Jafari M, Logan M, Wang Y, Yuan Y, Bae H, et al. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications [Internet]. Vol. 35, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2017 [cited 2021 Feb 28]. p. 530–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017300587>
58. Kasper FK, Tanahashi K, Fisher JP, Mikos AG. Synthesis of Poly(Propylene Fumarate). *Nature protocols* [Internet]. 2009 [cited 2021 Oct 17];4(4):518. Available from: </pmc/articles/PMC3076598/>
59. JM A, A R, DT C. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology* [Internet]. 2008 Apr [cited 2021 Oct 17];20(2):86–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18162407/>
60. Yim ES, Zhao B, Myung D, Kourtis LC, Frank CW, Carter D, et al. Biocompatibility of poly(ethylene glycol)/poly(acrylic acid) interpenetrating polymer network hydrogel particles in RAW 264.7 macrophage and MG-63 osteoblast cell lines. 2008 [cited 2022 Jan 22]; Available from: [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)
61. Kou PM, Babensee JE. Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2022 Jan 17];96A(1):239–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.a.32971>
62. Rodrigo Sánchez AM. Estudio de la biocompatibilidad del polietileno, de la aleación MA 956 y de la alumina: respuesta de osteoblastos y macrófagos frente a las partículas [Internet]. [Madrid]; 2001 [cited 2022 Jan 17]. Available from: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/7319/1/T25034.pdf>
63. Yan J, Yang L, Wang G, Xiao Y, Zhang B, Qi N. Biocompatibility evaluation of chitosan-based injectable hydrogels for the culturing mice mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Biomaterials Applications* [Internet]. 2010 Mar 18 [cited 2022 Jan 20];24(7):625–37. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0885328208100536>
64. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: state of the union. *Drug discovery today* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jan

- 24];19(6):781–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24768619/>
65. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Frontiers in Bioscience* [Internet]. 2008 [cited 2022 Jan 24];13(6):2001–21. Available from: <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/regulation-of-osteogenic-differentiation-during-skeletal-developm>
  66. Keong LC, Halim AS. In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical-Grade Chitosan Derivatives in Wound Management. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2009 Mar [cited 2021 Nov 10];10(3):1300. Available from: </pmc/articles/PMC2672031/>
  67. Garcia SN, Gutierrez L, McNulty A. Real-time cellular analysis as a novel approach for in vitro cytotoxicity testing of medical device extracts. *Journal of biomedical materials research Part A* [Internet]. 2013 Jul [cited 2021 Nov 17];101(7):2097–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23412941/>
  68. Katz D, Ito E, Lau KS, Mocanu JD, Bastianutto C, Schimmer AD, et al. Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates: Novel applications to combination therapies and high-throughput screening. *BioTechniques* [Internet]. 2008 Feb 16 [cited 2021 Nov 17];44(2):9–14. Available from: <https://www.future-science.com/doi/abs/10.2144/000112757>
  69. Bernard M, Jubeli E, Pungente M, Yagoubi N, Sci B. *Biomaterials Science*. 2016 [cited 2021 Nov 17];4. Available from: [www.rsc.org/biomaterialsscience](http://www.rsc.org/biomaterialsscience)
  70. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay-A comparative study. 2012 [cited 2021 Nov 18]; Available from: <http://www.ro-journal.com/content/7/1/1>
  71. Jackson N, Assad M, Vollmer D, Stanley J, Chagnon M. Histopathological Evaluation of Orthopedic Medical Devices: The State-of-the-art in Animal

- Models, Imaging, and Histomorphometry Techniques. *Toxicologic Pathology* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Nov 17];47(3):280–96. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0192623318821083>
72. Cheong HI, Johnson J, Cormier M, Hosseini K. In vitro cytotoxicity of eight beta-blockers in human corneal epithelial and retinal pigment epithelial cell lines: comparison with epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* [Internet]. 2008 Jun [cited 2021 Nov 17];22(4):1070–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18316173/>
  73. Huzum B, Puha B, Necoara RM, Gheorghevici S, Puha G, Filip A, et al. Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine* [Internet]. 2021 Sep 17 [cited 2021 Nov 17];22(5). Available from: </pmc/articles/PMC8461597/>
  74. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 2006;160:171–7.
  75. Han X, Gelein R, Corson N, Wade-Mercer P, Jiang J, Biswas P, et al. Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*. 2011;287:99–104.
  76. Ghobril C, Grinstaff MW. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial. 2015 [cited 2021 Nov 10]; Available from: [www.rsc.org/csr](http://www.rsc.org/csr)
  77. S N, M J, F E, K R, A K, P C. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* [Internet]. 2013 Mar 10 [cited 2021 Oct 17];166(2):182–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23262199/>
  78. Kohane DS, Langer R. Biocompatibility and drug delivery systems. *Chemical Science* [Internet]. 2010 Sep 7 [cited 2021 Oct 17];1(4):441–6.



Available

from:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/sc/c0sc00203h>

79. Smith EL, Kanczler JM, Gothard D, Roberts CA, Wells JA, White LJ, et al. Evaluation of skeletal tissue repair, part 1: assessment of novel growth-factor-releasing hydrogels in an ex vivo chick femur defect model. *Acta biomaterialia* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2022 Feb 22];10(10):4186–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24937137/>
80. Bulman SE, Coleman CM, Murphy JM, Medcalf N, Ryan AE, Barry F. Pullulan: A new cytoadhesive for cell-mediated cartilage repair. *Stem Cell Research and Therapy* [Internet]. 2015 Mar 19 [cited 2021 Feb 28];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25889571/>
81. Paduano F, Marrelli M, Alom N, Amer M, White LJ, Shakesheff KM, et al. Decellularized bone extracellular matrix and human dental pulp stem cells as a construct for bone regeneration. *Journal of biomaterials science Polymer edition* [Internet]. 2017 May 24 [cited 2022 Feb 26];28(8):730–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28285576/>
82. Huang Z, Yu B, Feng Q, Li S, Chen Y, Luo L. In situ-forming chitosan/nano-hydroxyapatite/collagen gel for the delivery of bone marrow mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*. 2011 Apr 22;85(1):261–7.
83. Zhong G, Yao J, Huang X, Luo Y, Wang M, Han J, et al. Injectable ECM hydrogel for delivery of BMSCs enabled full-thickness meniscus repair in an orthotopic rat model. *Bioactive Materials*. 2020 Dec 1;5(4):871–9.
84. Viswanath A, Vanacker J, Germain L, Leprince JG, Diogenes A, Shakesheff KM, et al. Extracellular matrix-derived hydrogels for dental stem cell delivery. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2017 Jan 1;105(1):319–28.
85. Escudero Castellanos A. Evaluación de la biocompatibilidad in vitro de materiales polméricos para la regeneración de tejido cutáneo.

## 12 ANEXOS

### Anexo 1 Procedimiento ensayo de LDH

1. Los MØ y las AD-MSK obtenidas se desprenderán de la caja de cultivo agregando 500 µl de tripsina-EDTA 0.25% e incubando 5 minutos a 37° C.
2. Se colocará la suspensión celular en un tubo falcon de 15ml y se centrifugará a 1500 rpm durante 5 minutos.
3. Se decantará el sobrenadante y el pellet celular se resuspenderá en 1 ml de medio de cultivo para determinar la concentración y viabilidad celular en cámara de Neubauer mediante la tinción con azul de tripano.
4. Se sembrarán en una caja de 96 pocillos, 200 células en 200 µl de medio de cultivo condicionado y se incubarán 2 horas a 37° C. Después de la incubación se agregarán las diversas concentraciones de los materiales a evaluar y se incubarán a 37° C.
5. Terminada la incubación se retirará el medio de cultivo y se lavara con PBS 1x, se transferirán 50 µl de los sobrenadantes a un pozo nuevo y 50 µl del mix de substrato LDH-solución de tinción-cofactor y se incubara a temperatura ambiente durante 30 minutos protegida de la luz en aluminio.
6. La reacción se detendrá con 10 µl de HCl 1 N.
7. Por último, se realizará la lectura en un lector de placas a 490 nm.

## **Anexo 2 Procedimiento ensayo de MTT**

1. Los MØ y las AD-MSC obtenidas se desprenden de la caja de cultivo agregando 500 µl de tripsina-EDTA 0.25% e incubando 5 minutos a 37° C.
2. Se colocará la suspensión celular en un tubo falcon de 15 ml y se centrifugará a 1500 rpm durante 5 minutos.
3. Se decantará el sobrenadante y el pellet celular se resuspenderá en 1 ml de medio de cultivo para determinar la concentración y viabilidad celular en cámara de Neubauer mediante la tinción con azul de tripano.
4. Se sembrarán en tres cajas de 96 pozos 7,000 células en 200 µl de medio condicionado y se incubarán a 37° C.
5. Terminada la incubación se retirará 100 µl de medio de cultivo y se añadirán 15 µl de solución de tinción.
6. Se incubará durante 4 horas a 37° C, se añadirán 100 µl de solución de paro y se incubará a 4° C durante 1 hora.
7. Por último, se realizará la lectura en un lector de placas a 570 nm.