



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**UNIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación de regeneración ósea empleando matriz ósea  
desmineralizada y en combinación con hidroxiapatita**

Tesis que presenta

**M. en C. Alfredo del Rosario Ayala Ham**

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

**Directores de Tesis:**

Dr. Rosalío Ramos Payán

Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina

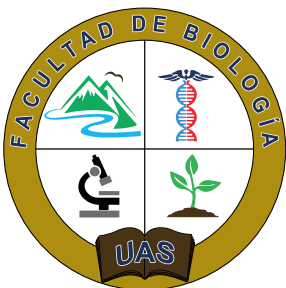
**Asesores Académicos:**

Dra. Josefina León Félix

Dra. Erika de Lourdes Silva Benítez

Dr. Alberto Kousuke de la Herrán Arita

Dr. José Geovanni Romero Quintana



Culiacán Rosales, Sinaloa, México. Junio del 2022



## 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.



Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Biología  
Posgrado en Ciencias Biológicas



## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD Y ANTIPLAGIO

A través de la presente Yo: Alfredo del Rosario Ayala Ham, con número de cuenta: 9118304-9 y alumno del Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, con sede en la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

### DECLARO QUE:

El trabajo de tesis que presento para su defensa y el cual se titula: EVALUACIÓN DE REGENERACIÓN ÓSEA EMPLEANDO MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA Y EN COMBINACIÓN CON HIDROXIAPATITA

- 1.- Es el resultado de un trabajo personal y constituye un documento original e inédito.
- 2 Los documentos, artículos, informes, etc. utilizados para la realización del trabajo están referenciados de forma clara, tanto en el texto principal como en el apartado de bibliografía de la presente tesis.
- 3 Que las citas de las obras que aparecen reflejadas de forma literal y entre comillas, presentan clara especificación de la fuente (autor, año) de la que han sido extraídas.
- 4.-Tengo conocimiento que no puedo asumir como propio el trabajo de tesis de otra persona, la copia de frases, párrafos e ideas de otro trabajo sin citar autoría; la copia de material, sin citar autoría, o cualquier otra acción de similares características conlleva a la realización fraudulenta del manuscrito de tesis y podrá implicar la suspensión del examen de grado en tanto no se corrija o bien la suspensión definitiva, esto acorde con el nivel en que se pudiese incurrir.
- 5.-Soy consciente de que pretender ser el autor de un trabajo, en parte o en su totalidad, escrito por otra persona constituye un delito con base en los artículos 424 y 427 del código penal federal, título vigesimosexto de los delitos en materia de derechos de autor en la República Mexicana.

Culiacán, Sinaloa a 01 de julio 2022

\_\_\_\_\_  
M. en C. Alfredo del Rosario Ayala Ham



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
REPOSITORIO INSTITUCIONAL

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Sinaloa el día 01 del mes de julio del año 2022, el que suscribe Alfredo del Rosario Ayala Ham alumno del Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS con número de cuenta 9118304-9, de la Unidad Académica Facultad de Biología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la direcciones de Dr. Rosalío Ramos Payán y Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina y de acuerdo al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor, cede los derechos del trabajo intitulado“ EVALUACIÓN DE REGENERACIÓN ÓSEA EMPLEANDO MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA Y EN COMBINACIÓN CON HIDROXIAPATITA”,a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su publicación, difusión, edición,reedición, traducción, compilación, distribución y explotación en medios impresos ydigitales, con fines académicos y de investigación, la que será titular del mismo, enforma conjunta o separada con el autor.

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 ésta 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 perseguidoy sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

En apego al Art. 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor Cedo el derecho de publicación, difusión, edición, reedición, traducción, compilación, distribución y explotación en medios impresos y digitales, con fines académicos y de investigacióna la Universidad Autónoma de Sinaloa.

---

M. en C. Alfredo del Rosario Ayala Ham



Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Biología  
Posgrado en Ciencias Biológicas



### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa siendo las 12-horas del día 01 del mes de julio del año 2022, se reunieron los miembros del Comité de tesis del (la) alumno: Alfredo del Rosario Ayala Ham con número de cuenta: 9118304-9 inscrito en el Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS para revisar la tesis titulada: “EVALUACIÓN DE REGENERACIÓN ÓSEA EMPLEANDO MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA Y EN COMBINACIÓN CON HIDROXIAPATITA.


Una vez realizado el análisis de similitud por medio del software antiplagio VIPER se obtuvo una similitud del ----14-----% (**Se adjunta informe del resultado de análisis**).


Como resultado de la revisión completa en cuanto a contenido, estructura, interpretación, redacción y ubicación de los textos que presentaron similitud con otros documentos, se llegó al acuerdo que la tesis en evaluación **NO INCURRE EN UN POSIBLE PLAGIO**.

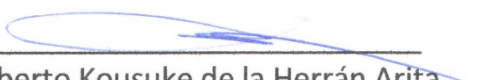
La resolución se emite con base a qué se obtuvo un porcentaje de similitud del ----14%---- --del contenido global del manuscrito, de un máximo permitido del 15% acorde con el software VIPER.

Con base a lo anterior y al intercambio de opiniones, los miembros del Comité de tesis acordaron Aprobar la tesis por Unanimidad Indicando que el documento cumple con todos los requisitos académicos y de estructura para ser presentado ante un jurado.


#### COMITÉ DE TESIS

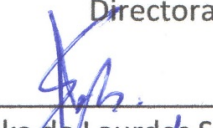
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rosalío Ramos Payán  
Director

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Josefina León Félix  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Kousuke de la Herrán Arita  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Hipólito Castillo Ureta  
Coordinador del Programa de Posgrado

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina  
Directora

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Erika de Lourdes Silva Benítez  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Geovanni Romero-Quintana  
Asesor

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Rosalio Ramos Payan y a la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina por darme la oportunidad de ser mis directores de tesis y apoyarme académicamente, así como la realización de la investigación en sus laboratorios y el apoyo emocional para cada día estimularme a ser mejor alumno y maestro con su ejemplo. Al Dr. Juan Ignacio Sarmiento Sánchez (DEP), por todos sus consejos y apoyo de manera profesional, pero principalmente, personal, extraordinario investigador y mejor persona.

Agradezco a todos mis maestros del posgrado por compartir sus conocimientos, experiencia y por el interés de enseñarnos y gracias a ello ser mejores profesionistas y estar siempre con el ánimo de apoyarnos. También me gustaría agradecer a mis compañeros de doctorado que en los primeros dos años vivíamos la misma experiencia, compromisos y nos alentábamos a seguir adelante cuando algo del posgrado no lo hacíamos del todo bien. A mis compañeros de los Laboratorios de Microbiología Molecular y el de Inmunología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Germán y Jorge que veníamos a trabajar en nuestros proyectos en vacaciones, pandemia, sábados y domingos a veces no con tantas ganas, para adelantar en los proyectos, también al Dr. Geovanni Romero Quintana que siempre nos ayudaba, así como a Marianita y Erick que nos apoyaban y los tesisistas de licenciatura, servicio social y maestría que ahí laboraron, que fueron muchos pero nos ayudaban sobre todo en el Bioterio.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 TEJIDO ÓSEO .....	8
1.1.1 Tipos de tejido óseo.....	8
1.1.2 Tipos celulares.....	9
1.1.3 Matriz extracelular ósea.....	10
1.2 INGENIERÍA TISULAR .....	13
1.2.1 MECANISMOS DE REGENERACIÓN TISULAR.....	14
1.2.2 TIPOS Y FUENTES DE INJERTOS.....	15
1.2.3 Matriz extracelular.....	16
2 ANTECEDENTES .....	18
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
4 JUSTIFICACIÓN.....	21
5 HIPÓTESIS .....	22
6 OBJETIVOS (GENERAL Y ESPECIFICOS).....	23
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23

7	METODOLOGIA.....	24
7.1	ÁREA DE ESTUDIO .....	24
7.2	TIPO DE ESTUDIO .....	24
7.2.1	CUADRO DE VARIABLES .....	24
7.2.2	GRUPOS DE ESTUDIO .....	25
7.3	LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	25
7.4	FINANCIAMIENTO Y/O BECAS .....	25
7.5	PRIMERA FASE: OBTENCIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA (ECM)	
	25	
7.5.1	Extracción de Matriz Ósea Desmineralizada Bovina (bBM) y descelularización	
	25	
7.5.2	Digestión enzimática y preparación de hidrogel (bECMh) .....	26
7.5.3	Evaluación del contenido celular residual (Histología y qPCR) .....	27
7.5.4	Análisis de proteínas.....	27
7.6	SEGUNDA FASE: EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	28
7.6.1	Preparación de extractos de bECMh para ensayos de biocompatibilidad .....	28
7.6.2	Análisis de viabilidad celular .....	29
7.6.3	Citotoxicidad del ensayo bECMh.....	29
7.6.4	Análisis de viva y muerte .....	29
7.6.5	Análisis de expresión de citocinas.....	30



7.7	TERCERA FASE: EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> .....	30
7.7.1	Cuidado y manejo de ratas Wistar.....	30
7.7.2	Modelo experimental en rata Wistar .....	31
7.7.3	Biocompatibilidad <i>in vivo</i> .....	33
7.7.4	Evaluación de Regeneración ósea .....	33
7.7.5	Evaluación Histológica.....	35
8	RESULTADOS .....	37
8.1	PREPARACIÓN Y ANALISIS DEL bECMh .....	37
8.1.1	Extracción de ECM .....	37
8.1.2	Digestión enzimática de ECM.....	39
8.1.3	Gelificación. ....	41
8.1.4	Contenido celular y Contenido Proteico.....	43
8.2	BIOCOMPATIBILIDAD <i>IN VITRO</i> .....	45
8.2.1	Viabilidad celular y citotoxicidad.....	45
8.2.2	Ensayo vida/muerte .....	49
8.2.3	Expresión de citocinas .....	51
8.3	BIOCOMPATIBILIDAD <i>IN VIVO</i> .....	53
8.4	EVALUACIÓN DE REGENERACIÓN ÓSEA .....	55
9	DISCUSIÓN.....	61
10	CONCLUSIONES.....	67

11	PERSPECTIVAS .....	68
12	REFERENCIAS .....	69
13	ÍNDICE DE FIGURAS .....	75
14	ÍNDICE DE CUADROS .....	76
15	ANEXOS .....	77

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** En la actualidad, los biomateriales utilizados como andamios para la regeneración ósea deben ser fáciles de administrar en el área del defecto. Los hidrogeles de matriz extracelular (ECM) son polímeros altamente hidratados que pueden rellenar formas irregulares y actuar como materiales bioactivos. Por otra parte, hidroxiapatita (HA) ha utilizada extensamente en reparación de dichos defectos óseos. Sin embargo, la formulación de un biomaterial idóneo para tal objetivo, aún sigue pendiente, por lo que la investigación en esta área se torna prioritaria. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto de un hidrogel de ECM derivado de hueso bovino (bECMh) sobre la proliferación, citotoxicidad y expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos, fibroblastos y células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AD-MCS), las cuales son células involucradas en la regeneración de tejidos *in vitro*, así como su biocompatibilidad *in vivo* en dorso y regeneración ósea en calota de ratas Wistar. **MATERIALES Y MÉTODOS:** *In vitro*, usamos extracto de bECMh para evaluar su efecto en macrófagos, fibroblastos y AD-MCS. La proliferación celular se midió utilizando ensayo MTT, y citotoxicidad se midió mediante cuantificación de liberación de lactato deshidrogenasa y ensayos de imágenes de células vivas/muertas. Las concentraciones de IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1 y TNF- $\alpha$  se cuantificaron en los sobrenadantes utilizando un arreglo de perlas citométricas (CBAs). Para el análisis *in vivo* de biocompatibilidad, se inoculó bECMh en la subdermis dorsal de ratas Wistar. Los especímenes fueron sacrificados a las 24 h para estudio histológico. Para la evaluación de regeneración se realizó un defecto óseo crítico en calota y se colocó bECMh y

bECMh con Hidroxiapatita (bECMh+HA) por 6 meses. **RESULTADOS:** *In vitro*, este hidrogel se comporta como un biomaterial dinámico aumentando proliferación de fibroblastos, induce producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos, entre las que destacan MCP-1 y TNF- $\alpha$ . *In vivo*, bECMh permite colonización de células polimorfonucleares y similares a fibroblastos en dorso, sin daño ni inflamación tisular y en el estudio de regeneración ósea observamos histológicamente un tejido similar a hueso a 6 meses en bECMh, mientras que bECMh+HA, generó un tejido osteoide irregular. **CONCLUSIONES:** Estos resultados indican que bECMh es un material biocompatible para regenerar el tejido óseo y podría usarse como andamio, potenciando proliferación y permitiendo el relleno de defectos óseos para su regeneración.

**Palabras clave.** Hidrogel de matriz extracelular bovina, Matriz ósea desmineralizada, Biocompatibilidad, Regeneración, Biomaterial, hidroxiapatita.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Currently, the biomaterials used as scaffolds must be easy to administer in the area of the bone defect. Extracellular matrix (ECM) hydrogels are highly hydrated polymers that can fill irregular shapes and act as bioactive materials, thus hydroxyapatite (HA) has been used in such bone defects **OBJECTIVE:** to evaluate the effects of bovine bone-derived ECM hydrogels (bECMh ) and biofunctionalized with HA on the proliferation, cytotoxicity and expression of proinflammatory cytokines in three types of cells involved in tissue regeneration in vitro, as well as their biocompatibility in the back and bone regeneration in the skull of Wistar rats in vivo. **MATERIALS AND METHODS:** In vitro, we used bECMh extract to evaluate them in macrophages, fibroblasts, and adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MCS). Cell proliferation was measured using the MTT assay, and cytotoxicity was measured by quantification of lactate dehydrogenase release and live/dead cell imaging assays. IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, and TNF- $\alpha$  concentrations were quantified in supernatants using a microsphere-based cytometric bead array. For in vivo biocompatibility analysis, bECMh was inoculated into the dorsal subdermis of Wistar rats. The specimens were sacrificed at 24 h for histological study. For the evaluation of regeneration, a critical bone defect was made in the skull and bECMh and bECMh with HA were placed for up to 6 months. **RESULTS:** In vitro, this hydrogel behaves as a dynamic biomaterial increasing fibroblast proliferation, induces production of proinflammatory cytokines in macrophages, among which MCP-1 and TNF- $\alpha$  stand out. In vivo, hECM allows colonization of polymorphonuclear cells and fibroblast-like cells in the back, without tissue damage or inflammation, and in the bone regeneration study we observed histologically a

bone-like tissue at 6 months in hECM and hECM with HA, an irregular osteoid tissue.

**CONCLUSIONS:** These results indicate that bECMh and bECMh with HA is a biocompatible material that regenerates lost tissue and could be used as a scaffold, enhancing proliferation and allowing the filling of bone defects for regeneration.

**Keywords.** Bovine extracellular matrix hydrogel, Demineralized bone matrix, Biocompatibility, Regeneration, Biomaterial, hydroxyapatite.

# 1 INTRODUCCIÓN

Los accidentes laborales, deportivos, vehiculares, enfermedades degenerativas e infecciones pueden producir daños tisulares extensos al igual que fracturas de huesos y cartílagos que requieren cirugía para su reconstrucción y rehabilitación ante esta problemática se forma una nueva ciencia llamada ingeniería tisular aplica conocimientos interdisciplinarios para resolver problemas relacionados con pérdida de tejido utilizando materiales, células y/o moléculas bioactivas capaces de estimular una respuesta celular y molecular de forma controlada (Noori et al., 2017). A pesar que el cuerpo presenta propiedades intrínsecas de reparación, existen situaciones en la lesión es grave y no permite que éstas logren una regeneración completa, dicha regeneración está dictada por tres factores(Roddy et al., 2018), que juntos son capaces de restaurar funciones de órganos afectados o enfermos (Holzapfel et al., 2017): matriz extracelular definida por sus siglas en inglés (ECM) proporciona un andamiaje, biomoléculas de señalización que regulan el crecimiento y diferenciación celular, y células requeridas para formación de tejido (Vieira et al., 2017). Por lo tanto, se logrará una regeneración completa si se proporciona un andamio estructural que le confiera propiedades mecánicas, pero también que estimule la migración de poblaciones celulares (Bhattacharjee et al., 2017).

Un propiedad importante que debe poseer el andamio es estimular de manera efectiva la transportación de poblaciones celulares, proporcionando una estructura que confiera propiedades mecánicas adecuadas al tejido, además, el andamio idealmente debe degradarse

en un rango de tiempo comparable con el crecimiento del nuevo tejido, dejando un tejido reparado o regenerado (Lee et al., 2014).

El uso de injerto autógeno es la opción óptima para tratar las lesiones de tejido mineralizado ya que provoca un menor rechazo inmunológico (Barootchi et al., 2020). Sin embargo, el uso de injertos del mismo paciente tiene algunas desventajas, como una segunda intervención quirúrgica y la probabilidad de infección. Por esta razón, se han desarrollado una variedad de materiales para la ingeniería de tejidos mineralizados, siendo los componentes aislados más utilizados de la ECM (Tejo-Otero & Ritchie, 2021; Xing et al., 2020).

La ECM es el material de andamiaje biológico natural e ideal. Por esta razón, en condiciones naturales, es diseñado y producido a la medida por las células residentes de cada tejido y órgano (Saldin et al., 2017). Las funciones principales de ECM son apoyar y proporcionar el andamiaje y la señalización para que las células se comuniquen entre sí y con su entorno externo (Saldin et al., 2017). La composición de la ECM no se ha descrito completamente, por esta razón, la síntesis de una ECM emulada *in vitro* aún no es posible. Sin embargo, se puede realizar el aislamiento de componentes individuales de ECM como colágeno, fibronectina, laminina y ácido hialurónico. Además, los andamios de ECM también se pueden recolectar de diferentes tejidos como hueso, intestino delgado, hígado, páncreas, piel y vejiga urinaria, entre otros (Edgar et al., 2018).

Hoy en día, existe una demanda de materiales que permitan una fácil administración por inyección y que puedan reticularse *in vivo* para formar un andamio. Estos requisitos se cumplen mediante formulaciones de hidrogel que dan como resultado un andamio hidrofílico



reticulado físico y químico que se puede utilizar para administrar moléculas biológicas y proporciona un entorno 3D similar a la ECM nativa (Kim et al., 2018). Los hidrogeles se definen como materiales poliméricos altamente hidratados (>30 % de agua en peso). Los hidrogeles de ECM ofrecen beneficios como la inyectabilidad, la capacidad de llenar un espacio de forma irregular y la bioactividad suficiente de una matriz nativa (Wu et al., 2020). Las cadenas poliméricas pueden ser sintéticas o naturales como alginato, quitosano, colágeno, ácido hialurónico. Se pueden aplicar hidrogeles sintéticos y naturales para llenar espacios, administrar moléculas bioactivas, medicamentos y células para estimular el crecimiento de tejidos (Garske et al., 2020). Los hidrogeles naturales pueden aislarse de tejidos humanos, porcinos y bovinos y pueden usarse para proliferación, diferenciación celular y estimulación de la formación de tejidos (Hung et al., 2013; Kundu et al., 2020).

Los hidrogeles se han considerado el biomaterial de elección para aplicaciones de ingeniería de tejidos y la evidencia respalda que los hidrogeles de ECM derivados de hueso bovino (bECMh) pueden promover proliferación, así como la diferenciación osteogénica de líneas celulares y células primarias *in vitro* (Su et al., 2021) (Ma et al., 2012). Sin embargo, la mayor parte de la perspectiva de los estudios se basa en el estudio de un solo tipo de célula o tejido. Además, existe una brecha en la determinación de la biocompatibilidad y los efectos de bECMh *in vivo*. Por lo tanto, el enfoque del presente artículo es mostrar los efectos de bECMh sobre la proliferación, citotoxicidad y expresión de citoquinas proinflamatorias *in vitro* en células involucradas en la regeneración de tejidos como macrófagos, fibroblastos y células madre mesenquimales, así como biocompatibilidad *in vivo* (Chaudhuri et al., 2020).

Por lo tanto, es de vital importancia conocer el tejido que deseamos regenerar como lo es el tejido óseo y sus componentes y estructura y la forma como podemos facilitar su desarrollo y crecimiento.

## **1.1 TEJIDO ÓSEO**

El tejido óseo es un tejido conectivo denso caracterizado la mineralización de la matriz extracelular (ECM, extracellular matrix), proporcionando gran dureza. Morfológicamente, presenta ciertas similitudes al tejido cartilaginoso ya que ambos están contruidos por células rodeadas por una EMC amorfa. Las células del hueso, denominadas osteocitos, están localizadas en unos espacios del tejido óseo denominados osteoplastos.

Entre algunas de las funciones del tejido óseo tenemos:

- Sostén. Lugar de fijación de músculos y tendones.
- Protección. Órganos vitales de cabeza y cavidad torácica.
- Regulación de calcio. Depósito de calcio.

### **1.1.1 Tipos de tejido óseo**

Existen dos tipos de tejido óseo atendiendo a sus características macroscópicas: compacto y esponjoso (o laminar). El tejido óseo compacto está formado por una masa compacta con pocos espacios y en su interior se forma una cavidad que alberga a la medula ósea amarilla. Mientras que el tejido esponjoso está constituido por finas trabéculas que se entrecruzan

dando lugar a una forma de red, cuyos espacios están intercomunicados y albergan la médula ósea roja (Welsch & Sobotta, 2008).

### **1.1.2 Tipos celulares**

Las células del tejido óseo son las células osteogénicas, los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. Las células osteogénicas se originan de las células madres o troncales mesenquimales (MSCs, mesenchymal stem cells). Las MSCs tienen morfología fusiforme y se encuentran constituyendo la capa más profunda del periostio y del endostio y en las paredes de los conductos de Havers, que llevan al interior del hueso los vasos sanguíneos para el aporte de oxígeno y nutrientes, así como para la eliminación de sustancias de desecho.

Los osteoblastos son las células que sintetizan los componentes de la matriz ósea, se localizan en la superficie externa de los huesos en crecimiento, adosadas sobre espículas óseas formando una lámina como un epitelio simple cúbico con prolongaciones que se introducen osteoide, el cual está formado por ECM orgánica (principalmente fibras de colágeno) no mineralizadas. El depósito de sales de calcio se produce de 8 a 10 días después de que se hayan liberado las moléculas de tropocolágeno.

Los osteocitos se originan a partir de los osteoblastos cuando pierden la capacidad de síntesis, estas células quedan atrapadas en la matriz ósea mineralizada, formando lagunas. Los osteocitos se comunican entre sí mediante prolongaciones citoplasmáticas a través de los canalículos óseos o calcóforos. Estas células intervienen en el mantenimiento del buen estado de la matriz ósea y desempeñan un importante papel en el intercambio de calcio con la sangre.

Los osteoclastos son células cuya misión es la reabsorción ósea, que tiene lugar en los procesos de crecimiento y reparación del hueso, así como la eliminación de porciones de matriz ósea alteradas o debilitadas. Se localizan en la superficie interna del hueso, constituyendo una especie de monocapa. Se originan a partir de los monocitos. Secretan enzimas capaces de atacar la matriz de hueso y liberar el calcio atrapado en ella (Welsch & Sobotta, 2008).

### **1.1.3 Matriz extracelular ósea**

Alrededor del 99% del volumen de la EMC ósea se encuentra mineralizada. El componente orgánico está integrado por colágeno tipo I (85-90%) y una pequeña proporción de otras proteínas (10-15%) como proteoglicanos (biglicano, decorina), proteínas indicadas en la adhesión celular (trombospondina, osteonectina, sialoproteína ósea), osteocalcina, osteopontina, fosfatasa alcalina y factores de crecimiento. El componente inorgánico de la matriz está constituido en su mayor parte por fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxiapatita. La ECM matriz ósea que no se halla mineralizada constituye menos del 1% del volumen del total y se denomina osteoide. Esta composición del tejido óseo es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras de colágena le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión y las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión (Fitzgerald et al., 2004).

#### ***1.1.3.1 Proteínas no colagenas***

La matriz también contiene otras proteínas no colágenas que forman la sustancia fundamental del tejido óseo, que constituyen sólo el 10% del peso total de las proteínas de la matriz ósea, son indispensables para el desarrollo, el crecimiento, el remodelado y la reparación del hueso. Tanto el colágeno como los componentes de la sustancia fundamental se mineralizan para formar el tejido óseo. Los componentes principales de proteínas no colágenas que hay en la matriz ósea son los siguientes:

El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano que se encuentra en la EMC de todos los tejidos animales, es abundante en tejidos conectivos, tiene gran capacidad de hidratación, aporta a los tejidos resistencia a presiones mecánicas y otras funciones relacionadas con la comunicación y diferenciación celular. Interviene en las partes iniciales de la morfogénesis ósea.

El condroitin sulfato es un componente de la ECM importante en mantenimiento de la integridad estructural, componente mayoritario del cartílago y propiedad de retención de agua a estos proteoglicanos. Las proteínas Biglicano y decorina son componentes del tejido conectivo y se unen a las fibrillas de colágeno tipo I, jugando un importante papel en el ensamblaje de la ECM.

La osteocalcina es una proteína pequeña de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis.

La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, calcio y por hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la

regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células, es necesaria para la mineralización normal.

La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Se consideran un buen marcador de la actividad osteoblástica. Glicoproteínas como osteopontina, sialoproteína óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina son fundamentales en procesos de remodelado y regeneración ósea, reconocidas por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos. Actúan como receptores de superficie de células óseas permitiendo la adhesión de células a ECM y activando señales.

Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs, bone morphogenetic proteins) facilitan el reclutamiento y diferenciación de células mesenquimales (MSCs), inducen la formación de osteoblastos, capaces de provocar formación ósea en lugares ectópicos, responsables de la osteoinducción (Fitzgerald et al., 2004).

### ***1.1.3.2 Factores de crecimiento de matriz ósea***

Los factores de crecimiento son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares como hígado o plaquetas, que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células. Algunos factores de crecimiento se enlistan posteriormente.

Factor de crecimiento esquelético (hSGF). Presente en la matriz ósea, asociado con una proteína de enlace. Por sí solo puede unirse a la hidroxapatita. Incrementa la tasa de

formación ósea. Factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ). Los osteoblastos parecen ser los únicos que producen este mitógeno, que después es almacenado en la ECM para ser activo durante la resorción ósea.

Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1). La producción de este factor está estimulada por una variedad de agentes sistémicos que incluyen la hormona del crecimiento (GH). Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Implicado en el proceso de reparación de los tejidos. Además de estar involucrado en la Osteogénesis. Factor de crecimiento catiónico derivado del cartílago (FCCDC). Favorece la formación de tejido de granulación y de colágeno (Campos & Traumatología, 2010).

## **1.2 INGENIERÍA TISULAR**

La premisa básica de la ingeniería de tejidos es la manipulación controlada del microambiente extracelular pueda conducir al control de la capacidad de las células para organizarse, crecer, diferenciarse, formar una matriz ECM funcional y tejido nuevo. Dicho control es un proceso complejo que requiere señales autócrinas, parácrinas y endócrinas, señales de posición, interacción célula-matriz, fuerzas mecánicas y contacto célula-célula para medir la formación de la arquitectura 3D y su función (Antonio Campos Muñoz).

El microambiente que rodea a la célula es rico en señales moleculares de otras células. Éstas pueden ser señales autócrinas que afectan a la misma célula que libera la molécula, señales parácrinas que afectan las células cercanas y señales endócrinas que afectan a objetivos a

distancia. Los principales tipos de moléculas bioactivas utilizadas en la medicina regenerativa incluyen citocinas, hormonas y factores de transcripción, que pueden actuar inmediatamente sobre las células o ser almacenadas dentro de la ECM. Los factores de crecimiento y moléculas de señalización tienen la capacidad de estimular la proliferación y diferenciación celular.

La ingeniería de tejidos ha pasado progresivamente por tres etapas. En la primera se empleaban biomateriales inertes con la única finalidad de usarlos como estructura sustitutiva de algunas partes del cuerpo dañadas. En la segunda etapa se inició la aplicación de una matriz biodegradable o andamio biológico con una estructura porosa, trabecular, o reticular que se coloca en el tejido dañado para promover en él un microambiente apropiado para el crecimiento y propagación *in situ* de las células residentes sanas circundantes y que éstas puedan implantarse en el tejido o estar incorporadas al biomaterial que integra el andamio biológico, con la finalidad de acelerar la regeneración histórica. La tercera etapa nació con la reciente aparición de la nanotecnología y su aplicación a medicina, que ha llevado al concepto de nanomedicina (Antonio Campos Muñoz) .

### **1.2.1 MECANISMOS DE REGENERACIÓN TISULAR.**

La regeneración ósea es posible de obtener mediante la combinación de tres elementos: células viables, ECM y sustancias reguladoras insolubles (factores de crecimiento); sin dejar de mencionar factores locales que también son influyentes, como el entorno mecánico y vascular. La combinación de estos elementos genera un ambiente apropiado para la regeneración. Los mecanismos biológicos que proporciona una base para la regeneración



son: la osteoconducción que se produce cuando el material de injerto óseo sirve como andamio para el crecimiento de hueso que se perpetua en el hueso nativo. Los osteoblastos desde el margen del defecto utilizan el material del injerto óseo como osteoconductor; la osteoinducción que consiste en la estimulación de las células osteoprogenitoras de diferenciarse en osteoblastos, para la formación de hueso nuevo. El tipo más estudiado de los mediadores celulares osteoinductivos son las BMPs; la osteopromoción que implica la mejora de la osteoinducción sin la posesión de la propiedad osteoinductiva, por ejemplo, el esmalte derivado de matriz ha demostrado mejorar el efecto osteoinductivo del aloinjerto de hueso desmineralizado liofilizado, pero no estimula por sí solo el crecimiento de hueso; y la osteogénesis que se produce cuando los osteoblastos vitales procedentes del material de injerto óseo contribuyen al crecimiento de hueso nuevo con el crecimiento generado a través de los dos mecanismos (Raspall, 2006).

### **1.2.2 TIPOS Y FUENTES DE INJERTOS**

Los injertos empleados pueden ser de diferentes tipos y fuentes. El injerto óseo autólogo o autógeno consiste en la utilización de hueso obtenido a partir del mismo individuo. Cuando se llevará a cabo un injerto en bloque, el hueso autógeno es el preferido, ya que presenta menos riesgo de rechazo. Un aspecto negativo de los injertos autólogo es que se requiere de otra cirugía para tomar la muestra y potencia para el dolor postoperatorio y sus complicaciones. Cuando el injerto se obtiene de una persona diferente a la que va a recibir el injerto, se denomina aloinjerto. El aloinjerto se toma de cadáveres que han donado sus huesos.

El injerto que tiene su origen en una especie distinta a la humana, como la bovina es llamado xenoinjerto. Los xenoinjertos solo se distribuyen como una matriz calcificada. Los aloplásticos son injertos sintéticos que pueden estar hechos de hidroxiapatita, carbonato de calcio y fosfato tricálcico principalmente, un mineral natural que es también el componente principal del hueso. La hidroxiapatita es la más utilizada actualmente debido a su osteoconducción, dureza y aceptación por el hueso. En cambio, el carbonato de calcio, comienza a disminuir su uso, ya que es reabsorbible a corto plazo, lo que provoca que en poco tiempo el hueso se rompa nuevamente. Se utiliza también fosfato tricálcico en combinación con hidroxiapatita, para proporcionar un efecto de osteoinducción y reabsorción.

La regeneración de hueso depende de un andamio tridimensional adecuado, los biomateriales de origen natural se han utilizado en gran medida para construir andamios porosos con buena biocompatibilidad y biodegradables (Wang et al., 2008). Recientemente, la matriz extracelular (ECM) ha llamado la atención por su uso potencial en regeneración de tejidos (Raspall, 2006).

### **1.2.3 Matriz extracelular**

La mayoría de las características adecuadas para un biomaterial empleado en la regeneración ósea se encuentran presentes en la matriz extracelular (ECM), ésta es una mezcla compleja de proteínas funcionales y estructurales, glucoproteínas y proteoglicanos arreglados en una ultraestructura tridimensional que es única en cada localización anatómica (Brown & Badylak, 2014). Este andamiaje proporciona un soporte estructural, como sitios de unión para

las células superficiales y como reservorio de factores de señalización que modulan procesos como la angiogénesis, vasculogénesis, migración y proliferación celular (Badylak, 2002). Por estas propiedades versátiles, la ECM derivada de tejidos descelularizados ha sido explorada como fuente de andamios biológicos para ingeniería tisular y regenerativa (Hoshiba et al., 2010). La ECM es requerida para el acomodo de las células osteogénicas y guiar el crecimiento y regeneración tisular en tercera dimensión.

La ECM porcina podría ser un biomaterial para la regeneración de tejidos ya que puede estimular la diferenciación celular y abogar un rápido crecimiento del tejido del huésped. Para la acelerar la regeneración hueso, el injerto necesita contener un número muy grande de células progenitoras o células diferenciadas por factores bioactivos para atraer células osteoprogenitoras hacia la región del defecto. Los andamios de ECM han sido tomados de una gran variedad de tejidos porcinos (Badylak et al., 2009). Las ECM más usadas y estudiadas son las derivadas de submucosa de intestino delgado (SID) y de vejiga urinaria (MVU) (Badylak, 2004), aunque en un estudio realizado por Liu y col. en el 2011 se concluyó que la MVU presenta propiedades biológicas muy superiores (Liu et al., 2011).

## 2 ANTECEDENTES

La aplicación de procesos regenerativos en defectos apicomarginales mejora el resultado de cirugías perirradiculares (Abramowitz et al., 1994), por ello se emplean técnicas de regeneración en cirugía periapical es de vital importancia para acelerar el proceso de curación y permitir la regeneración de grandes lesiones (Tsesis et al., 2011). La regeneración tisular tienen un gran potencial, aunque sigue siendo limitada su capacidad de producir resultados aceptables en diferentes situaciones (von Arx & Alsaed, 2011). Una pregunta importante, con respecto a los diferentes tipos de defectos óseos asociados a cirugía periapical es cual biomaterial y técnicas son las más indicadas para lograr una regeneración ósea completa (Pecora et al., 2001). Una de estas opciones puede ser la ECM la cual representa una promesa en ingeniería de tejido óseo como andamio debido a su similitud en estructura y función del hueso autólogo (Honsawek et al., 2006). La ECM que se compone de materiales orgánicos, incluyendo el colágeno, proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) y factores de crecimiento, ayudando al reclutamiento de células progenitoras, así como promotor de migración celular y angiogénesis (Badylak, 2007; Cortiella et al., 2010) (Reynolds & Bowers, 1996).

La presencia de BMPs en aloinjertos desmineralizados inducen la diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas a osteoblastos y condroblastos (Urist, 1973). Dichas BMPs pertenecen a una familia numerosa de proteínas relacionadas, multifuncionales conocidas como TGF- $\beta$  que inducen proliferación celular, síntesis de colágeno, activan fosfatasa alcalina y síntesis de osteocalcina en osteoblastos presentes en la matriz ósea (Kingsley,

1994). Por lo descrito anteriormente, la aplicación de factores de crecimiento es el principal elemento en regeneración ósea (Nakashima & Reddi, 2003). Actualmente la combinación de factores de crecimiento con biomateriales se ha presentado como el concepto diamante o trinidad en regeneración con andamios (Giannoudis et al., 2008). La submucosa del intestino delgado porcino ha sido ampliamente utilizado como biomaterial con mínima respuesta inmunológica (Kropp, 1998). Contiene colágeno tipo I y III, pequeñas cantidades de colágeno tipo IV, V, y VI, factores de crecimiento fibroblasto (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1), TGF- $\beta$ , factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), glucosaminoglicanos, fibronectina, laminina, sulfato de heparina y ácido hialurónico (Voytik-Harbin et al., 1997).

### **3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La pérdida de tejido u órganos por accidentes, traumatismos, enfermedades o cirugía constituye un problema a nivel mundial, por ello, en los últimos años, el área médica se han realizado numerosas investigaciones encaminadas a regeneración, reparación o reemplazo de tejidos y órganos que han sido dañados. La “ingeniería tisular”, en esencia, realiza investigaciones para fabricar nuevos tejidos funcionales mediante un soporte (natural, sintético o mezcla de ambos). Para ello se construyen modelos equivalentes a órganos o tejidos, en los que las células se organizan y conseguir así, la reconstrucción final deseada para esto se requiere de tres elementos células para que formen el nuevo tejido, factores de crecimiento para guiar el desarrollo y una matriz extracelular de soporte, fundamental en la regeneración.

Para la regeneración de tejidos dañados o perdidos como el tejido óseo, se han realizado avances importantes, sin embargo, las investigaciones tienen un camino largo por recorrer, con el fin de que esta terapia sea confiable y sea aplicada en pacientes.

## 4 JUSTIFICACIÓN

La pérdida de tejido óseo constituye un problema frecuente a nivel mundial en el área de la biomedicina y uno de los grandes retos es la regeneración del tejido dañado o perdido por lesiones traumáticas, infecciones, patologías o cirugías. En ocasiones la destrucción o daño óseo es muy extenso y el cuerpo no puede repararse por sí mismo, de acuerdo a la ingeniería tisular se requiere de tres factores para lograr la regeneración del tejido unas células que los formen, factores de crecimiento y un factor muy importante un andamio o biomaterial existen diferentes biomateriales que promueven regeneración del tejido óseo dañado o perdido y uno de los que han demostrado más resultados prometedores, es la matriz ósea desmineralizada, sin embargo, el método de extracción, ya sea autólogo, o de la misma especie u otra especie no es muy clara, y por ello se requieren estudios adicionales para conocer el método ideal de extracción de la matriz extracelular así como también su composición, biocompatibilidad, tiempo necesario para la regeneración, así como su mecanismo de acción, por lo que biomaterial podría ser una de las vías para lograr esa regeneración esperada.

La hidroxiapatita es otro material para regeneración que ha mostrado su eficacia, aunque presenta algunas desventajas como el mayor tiempo de regeneración del tejido, más sin embargo se desconoce si pueda haber algún sinergismo en la utilización de estos materiales.

## 5 HIPÓTESIS

El hidrogel de ECM derivado de hueso bovino (bECMh) es biocompatible con células involucradas en el proceso regeneración tisular e *in vivo*. Además, bECMh y bECMh+HA son eficientes regeneración ósea en un defecto crítico *in vivo*.



## **6 OBJETIVOS (GENERAL Y ESPECIFICOS)**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la biocompatibilidad de un hidrogel de ECM derivado de hueso bovino (bECMh) y potencial de regeneración ósea solo en combinación con hidroxiapatita (bECMh+HA).

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Elaborar y evaluar la consistencia y el contenido proteico de un hidrogel de ECM derivado de hueso bovino (bECMh).
2. Biofuncionalizar el bECMh con hidroxiapatita (bECMh+HA).
3. Analizar la biocompatibilidad *in vitro* del bECMh sobre Macrófagos, Fibroblastos y células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AD-MCS).
4. Evaluar proceso de osteogénesis inducido por bECMh y bECMh+HA en ratas Wistar.

## 7 METODOLOGIA

### 7.1 ÁREA DE ESTUDIO

Esta investigación se incluye en las ciencias aplicadas, dentro del área de biotecnología, campo de medicina regenerativa, en disciplina de ingeniería tisular. Se empleará un enfoque cuantitativo, de alcance correlacional y un diseño de investigación experimental con posprueba y grupo control. La selección de la muestra será dirigida.

### 7.2 TIPO DE ESTUDIO

Prospectivo longitudinal, Experimental *in vitro* e *in vivo*.

#### 7.2.1 CUADRO DE VARIABLES

Tabla 1. Cuadro de Variables.

Formación de nuevo hueso	Variable independiente	Formación de tejido mineralizado	Análisis histológico
Biocompatibilidad	Variable independiente	Producción de formazan	Densidad óptica
Modelo regeneración <i>in vivo</i>	Variable dependiente	Defecto óseo	Cortes histológicos y análisis radiográfico

### **7.2.2 GRUPOS DE ESTUDIO**

- Grupo 1: Hidrogel de matriz ósea desmineralizada (bECMh)
- Grupo 2: Hidrogel de matriz ósea desmineralizada con hidroxiapatita (bECMh+HA).
- Grupo 3: Control negativo (sin andamio)
- Grupo 4: Control positivo (autoinjerto)

### **7.3 LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, Josefa Ortiz de Domínguez S/N y Avenida de las Américas, CP. 80010. Culiacán, Sinaloa, México.

### **7.4 FINANCIAMIENTO Y/O BECAS**

No aplica

### **7.5 PRIMERA FASE: OBTENCIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA (ECM)**

#### **7.5.1 Extracción de Matriz Ósea Desmineralizada Bovina (bBM) y descelularización**

Se utilizaron tibias bovinas recién extraídas de un rastro certificado. Los huesos fueron segmentados y divididos en tejido esponjoso y cortical, seleccionando hueso esponjoso para extracción de ECM siguiendo metodología de (Sawkins et al., 2013). A continuación, se procedió a desmineralizar el hueso esponjoso en HCl 0,5 N a temperatura ambiente durante 24 h con agitación, en un vaso precipitado a 300 rpm generando un pequeño vórtice; los huesos se suspendieron en el ácido, para posteriormente desmineralizar el material resultante de matriz ósea separándola por filtración con agua destilada.

Posteriormente, las muestras se almacenarán a -20°C durante la noche. Los lípidos fueron extraídos mezclando 1:1 de cloroformo/metanol, este procedimiento lo realizamos tres veces con un lavado final con metanol para finalmente agua destilada para retirar el cloroformo, después se exprimó y almacenarlo a -20 °C. la muestra desmineralizada fue congelada, y almacenada a -20°C. Para eliminar el material celular residual, la descelularización enzimática se realizó con una solución de tripsina al 0,25 % y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (GIBCO Life Technologies, EE. UU.) a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % en agitación por 24 h.

### **7.5.2 Digestión enzimática y preparación de hidrogel (bECMh)**

La digestión y solubilización se realizaron con pepsina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a una concentración de 1 mg/ml en HCl 0,01 N, se llevó a cabo en una placa de agitación a temperatura ambiente durante 96 horas hasta lograr la solubilización, para llegar a formar un pregel de ECM de hueso bovino (bECM). A continuación, Se indujo gelificación del pregel de bECM neutralizando pH adicionando un décimo del volumen de 0.1 N NaOH (1M) y

aforando con PBS 1X en hielo, la gelificación del pre- gel se dio después de 1 h a 37°C, formando bECMh.

### **7.5.3 Evaluación del contenido celular residual (Histología y qPCR)**

Se analizó el contenido celular, antes y después del uso de tripsina mediante histología se fijaron en formalina al 10 %, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5-7 µm. Los cortes se tiñeron con H&E y se tomaron imágenes a 10X y 40X utilizando un microscopio TCS SP8 (Leica, Alemania) para identificar núcleo visible. La evaluación de qPCR, Se extrajo DNA de la digestión con pepsina de la matriz liofilizada (10 mg/ml) usando 50:48:2 (vol.%) fenol/cloroformo/alcohol isoamilico. El DNA se precipito a partir de la fase acuosa a -20°C por adición de 0.1 volúmenes de 3M de acetato de sodio (pH 5.2) y 2 volúmenes las cuales continuación se congelaron con etanol. Posteriormente se centrifugo el DNA congelado durante 10 min a 10,000 g para formar un sedimento de DNA. El sedimento se lavó con etanol y se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 1 ml. La concentración de cada DNA extraído se determinó por espectrofotometría y qPCR. Se construyó una curva estándar mediante preparación de las muestras en concentración de DNA conocida a partir de 0 a 1000 ng/ml. Las muestras de DNA extraídas fueron diluidas para asegurar sus absorbancias cayeron dentro de la región lineal de curva estándar. Las muestras se leyeron usando un Espectrofotómetro Optizen POP PP0303-141120-04 Lector de placas.

### **7.5.4 Análisis de proteínas**

Para el análisis cualitativo del colágeno del bECMh, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato de sodio (SDS), usando poliacrilamida al 5 % (p/v) (Bio-Rad, EE. p/v) poliacrilamida para el gel de apilamiento. La bECMh y el colágeno tipo 1 purificado (COL-1) como control (Roche, Alemania) se prepararon en tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) que contenía SDS al 10 %, glicerol al 30 %, 2-mercaptoetanol al 1 % y mercaptoetanol al 0,02 %. % de azul de bromofenol y posteriormente se calentó a 95 °C durante 5 min. A continuación, se cargaron y sometieron a electroforesis 4 µL de un marcador de proteína (Himark Unstained protein Standard, Thermo, EE. UU.) y 5 µL de las muestras a 100 V en geles de placas verticales hasta que el azul de bromofenol salió del gel. Los geles de poliacrilamida se tiñeron durante 2 h con azul de Coomassie R-250 al 0,1 % en ácido acético/metanol/agua 2:5:5 (v/v/v) y se destiñeron con ácido acético al 7,5 /metanol al 15%.

## **7.6 SEGUNDA FASE: EVALUACIÓN *IN VITRO***

### **7.6.1 Preparación de extractos de bECMh para ensayos de biocompatibilidad**

Los extractos solubles de bECMh se prepararon de la forma siguiente: 1 ml de hidrogel (40 mg/ml) y 9 ml de DMEM colocándolo con vidrio de 0,05 mm en un disruptor de tejidos por 1 minuto a máxima velocidad (Disruptor Genie, Scientific Industries, EE. UU.) y se incubaron a 37 °C con agitación orbital lenta constante durante 24 h. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm, los sobrenadantes recuperados se filtraron con una membrana de 0,22 µm (Cytiva Whatman, Uniflo Syringe Filters, EE. UU.) y luego se usaron para ensayos de expresión de LDH, MTT, vivo/muerto y citoquinas. Las células tratadas con DMEM se usaron como controles.

### **7.6.2 Análisis de viabilidad celular**

La proliferación/viabilidad celular se evaluó utilizando ensayo MTT (CellTiter 96 NON-Radioactive Cell Proliferation Assay, PROMEGA, EE. UU.). RAW 264.7, NIH/3T3 y AD-MCS se cultivaron en una placa de 96 pocillos con medio DMEM suplementado colocando  $7,5 \times 10^3$  células/pocillo. A las 24 h, los medios de cultivo se reemplazaron por los extractos solubles de bECMh y después de 24, 48 y 72 h de incubación se realizó la cuantificación. Posteriormente retiramos los medios y las células se incubaron con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Se añadieron 15  $\mu$ l de solución de MTT a cada pocillo durante 2 h. Luego se disolvieron las sales violetas de formazán añadiendo 100  $\mu$ l de solución de parada. La densidad óptica se midió a 570 nm en un lector de microplacas.

### **7.6.3 Citotoxicidad del ensayo bECMh**

RAW 264.7, NIH/3T3 y AD-MCS fueron cultivados en una placa de 96 pocillos con medio DMEM suplementado colocando  $15 \times 10^3$  células/pocillo. A las 24 h, el medio se reemplazó por extracto soluble de bECMh y, después de 24 h de incubación, se midió citotoxicidad mediante cuantificación de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes a través de un ensayo colorimétrico de acuerdo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich St. Louis MO, EE. UU.) La densidad óptica de las muestras se midió a 490 nm en un lector de microplacas.

### **7.6.4 Análisis de viva y muerte**

RAW 264.7, NIH/3T3 y AD-MCS se cultivaron en una placa de 24 pocillos con medio DMEM suplementado colocando  $10 \times 10^4$  células/pocillo. A las 24 h, los medios se reemplazaron por extracto soluble de bECMh y después de 24 h, las células fueron incubadas con naranja de triazol 84 nM (Sigma-Aldrich) y yoduro de propidio 4.3  $\mu$ M (Sigma-Aldrich) durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron examinadas usando un sistema de microscopio TCS SP8 a 40X. Se midieron las unidades relativas de fluorescencia (RFU) y obtuvimos los porcentajes de viabilidad celular.

#### **7.6.5 Análisis de expresión de citocinas**

RAW 264.7, fueron cultivados en una placa de 24 pocillos con medio DMEM suplementado colocando  $5 \times 10^5$  células/pocillo. A las 24 h, los medios fueron reemplazados por el extracto soluble de bECMh y después de 24 h de incubación, cuantificamos IL-6, IL-10, IL-12p70 y MCP-1 TNF- $\alpha$  de los sobrenadantes utilizando un arreglo de perlas citométricas en microesferas. (CBA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BD Bioscience, EE. UU.). Los datos se evaluaron con el citómetro de flujo Accury C6 y su cuantificación se realizó con el software FCAP Array v3.0 (BD Bioscience). Las células tratadas con LPS se usaron como controles positivos.

### **7.7 TERCERA FASE: EVALUACIÓN *IN VIVO***

#### **7.7.1 Cuidado y manejo de ratas Wistar**



Durante los experimentos se llevó a cabo de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud-2014 y las normas de salud NOM-062-ZOO-1999, las cuales buscan:

- Evitar al Máximo sufrimiento de los animales
- Usar procedimiento que garantice muerte sin sufrimiento
- Proporcionar máximo de comodidad, excepto cuando las variables experimentales lo justifiquen
- Proteger al personal de laboratorio involucrado

Para ello se diagnosticó las ratas de laboratorio sin signos de enfermedad, conducta anormal, dolor y sufrimiento. Se proporcionó alimento estéril y agua potable ad libitum, condiciones de temperatura y ventilación adecuadas, fueron agrupados de acuerdo a las condiciones y necesidades que se requieran.

Las jaulas donde se alojaron contaron con registros para adecuado control y se acondiciono con aserrín favoreciendo su aislamiento térmico y construcción de nido, garantizando así la absorción de su orina, excremento, desperdicio de agua y facilitar la desinfección.

La limpieza de las jaulas se realizó de manera periódica y los desechos, el manejo de cadáveres y residuos patológicos se llevó a acorde a Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 para los Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos.

#### **7.7.2 Modelo experimental en rata Wistar**

Se realizaron los análisis de biocompatibilidad en dorso y para evaluación de regeneración ósea en calota con los siguientes grupos experimentales

#### **7.7.2.1 Grupos de estudio**

- Grupo 1: Hidrogel de matriz ósea desmineralizada (bECMh)
- Grupo 2: Hidrogel de matriz ósea desmineralizada con hidroxiapatita (bECMh +HA).
- Grupo 3: Control negativo (sin andamio)
- Grupo 4: Control positivo (autoinjerto)

#### **7.7.2.2 Criterios de inclusión**

- Ratas Wistar macho aparentemente sanas.
- 4 meses de edad.
- Peso entre 250 a 350 gramos.

#### **7.7.2.3 Criterios de Exclusión**

- Ratas hembras.
- Ratas con alguna patología o infección.
- Ratas menores de 4 meses.

#### **7.7.2.4 Criterios de Eliminación**

- Ratas a las que no se les pueda realizar la cirugía.

- Ratas que sufran infección después de la intervención.
- Ratas que se mueran durante el estudio.

### **7.7.3 Biocompatibilidad *in vivo***

Se anestesiaron ratas Wistar de 3 meses (250-300 gr) mediante colocación de 1  $\mu$ L de cóctel sedante (70% Ketamina, 15% Xilazina, 15% agua inyectable) por mg de peso, por vía intramuscular. Se rasuró la espalda y desinfectó con alcohol al 70%. Con una jeringa de insulina, inoculamos en la subdermis 100  $\mu$ l de bECMh, control positivo (cloroformo, Sigma-Aldrich) y control negativo (PBS 1X), tomando como referencia la línea media de la espalda. Los especímenes se sacrificaron a las 24 H. Posteriormente, cortamos 2 cm de diámetro de tejido alrededor del área de inoculación. Se tomaron fotografías para evaluación macroscópica, posteriormente, se fijó el tejido con PBS 1X con paraformaldehído al 4% para examen histológico con (H&E) para observar reacción inflamatoria.

### **7.7.4 Evaluación de Regeneración ósea**

Un total de 12 ratas machos adultas fueron utilizadas 3 por cada grupo (2 de grupo de experimentación (bECMh y bECMh+HA) y 2 grupos controles positivo (autoinjerto) y negativo.

#### **7.7.4.1 *Preparación preoperatoria***

Los animales fueron pesados para colocar anestesia, observamos profundidad de anestesia por la falta de reflejo al pellizcar el dedo del pie, posteriormente fue afeitado en el área donde

se realizó la cirugía, para después desinfectar el área y las zonas circundantes con un hisopo con alcohol al 70%. colocamos un paño estéril sobre el cuerpo y los ojos.

#### ***7.7.4.2 Procedimiento Operatorio***

Utilizando bisturí realizamos una incisión de 1,5 cm hasta el periostio sobre el cuero cabelludo del hueso nasal para observar la bóveda craneal, separamos el periostio que cubre la bóveda craneal con el bisturí, empujando suavemente hacia los lados posteriormente utilizamos un retractor de tejidos blandos para separar los tejidos y exponer el hueso subyacente, irrigamos con solución salina estéril. El defecto crítico se realizó con una fresa trepanadora de 8 mm de diámetro (Hu-friedy) a 1500 rpm, irrigando la bóveda craneal, gota a gota con solución salina estéril (aproximadamente 1 gota cada 2 segundos).

Posterior al corte del hueso, procedimos a liberarlo de la duramadre, una vez liberado, se utilizó un elevador como brazo de palanca para separarlo de la bóveda craneal, con esto realizando el defecto crítico.

El defecto fue lavado con solución salina estéril para eliminar los fragmentos de hueso y para colocar los materiales de investigación en el defecto; se cerró el periostio cubriendo el material a evaluar, y suturamos con 3-0 de catgut, la piel sobre periostio.

#### ***7.7.4.3 Cuidado posoperatorio***

Una vez terminada el procedimiento quirúrgico, se limpió cuidadosamente la cabeza con solución salina para eliminar la sangre. Dejándola en observación por 24 horas para posteriormente, transferirla a las jaulas por separado hasta su sacrificio (6meses).

#### **7.7.4.4 *Sacrificio y toma de muestra***

Cumplidos los periodos de evaluación (12 y 16 semanas), se realizará la eutanasia de los modelos experimentales en una cámara de cloroformo. Se tomará una radiografía y la calota será almacenada en polyfreeze para su evaluación histológica con su respectiva identificación (Spicer et al., 2012).

Cumplidos los periodos de evaluación (12 y 16 semanas), se realizará el sacrificio de los modelos experimentales colocando pentobarbital sódico vía intraperitoneal.

#### **7.7.5 Evaluación Histológica**

##### **7.7.5.1 *Análisis Histológico***

Se realizaron cortes seriados de 7µm de espesor con la ayuda de un criostato (Leica CM-1520), las cuales fueron teñidas con hematoxilina eosina y rojo de alizarina para evaluar composición del tejido neoformado, con ayuda de un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Leica).

##### **7.7.5.2 *Metodología de la Tinción de Hematoxilina eosina***

1.- Se colocaron los portaobjetos con las muestras 1 minuto en hematoxilina.

- 2.- Se lavaron con agua destilada.
- 3.- Se colocaron los portaobjetos en bicarbonato de sodio al 0.01% por 1 minuto.
- 4.- Se colocaron en etanol ácido durante 20 segundos.
- 5.- Se colocaron en etanol al 70% por 30 segundos.
- 6.- Se colocaron en etanol al 100% por 15 segundos.
- 7.- Se colocaron en xileno durante 1 minuto.
- 8.- Se colocaron secar.
- 9.- Se montaron en resina (Entellan) una gotita en la preparación.

## **8 RESULTADOS**

### **8.1 PREPARACIÓN Y ANALISIS DEL bECMh**

#### **8.1.1 Extracción de ECM**

Los huesos de tibias bovinas se procesaron en fragmentos y desmineralizaron en solución ácida de HCl 0.5 N. La remoción de lípidos se logró con cloroformo/metanol, y se aplicó un procedimiento de descelularización enzimática a la matriz ósea desmineralizada (bDBM) para producir material de matriz descelularizada (bECM) (Figura 1).

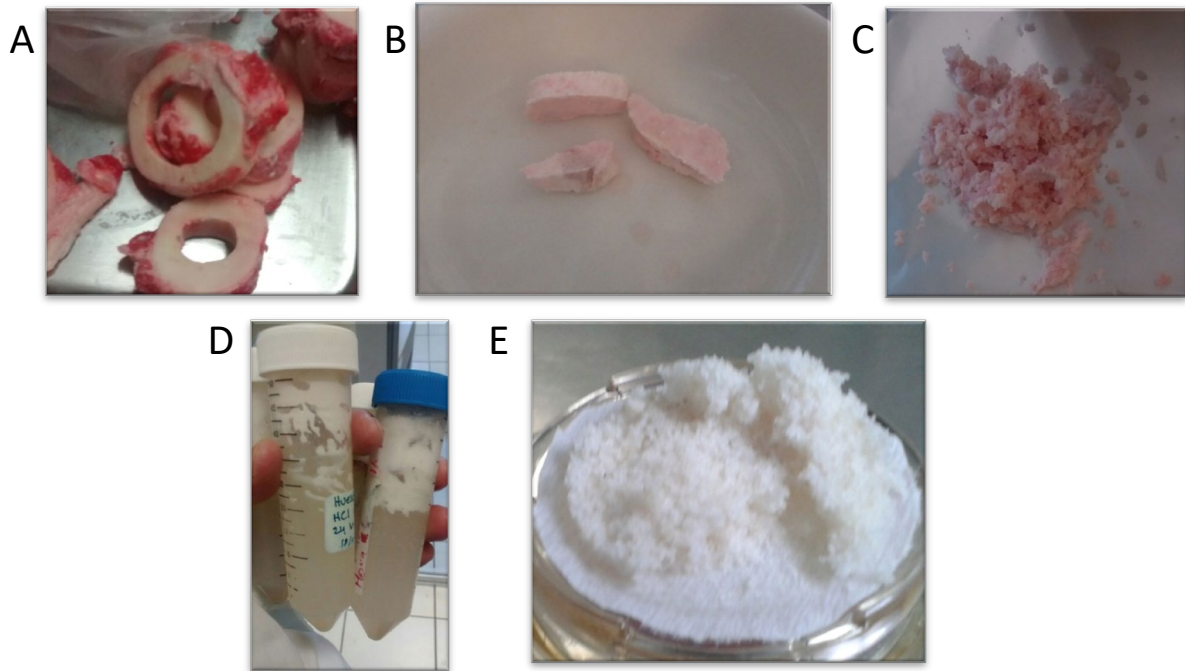


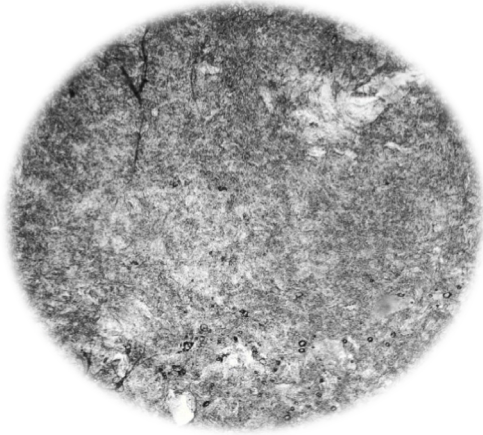
Figura 1. A) Extracción de hueso esponjoso, B) fragmentos del hueso, C) trititación del hueso, D) extracción de lípidos, E) hueso sin lípidos



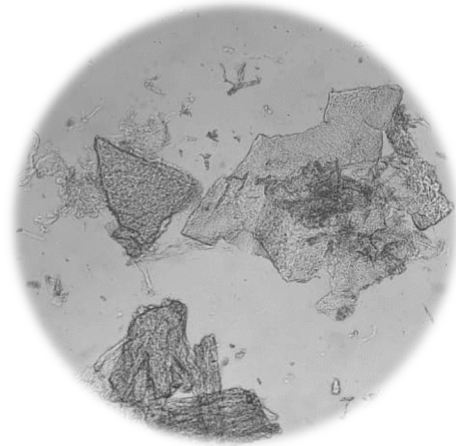
### **8.1.2 Digestión enzimática de ECM**

La digestión realizada con pepsina se logró a las 24 horas, verificándolo hasta que no se observara fragmento visible de matriz (Figura 2).

## Monitoreo digestión enzimática (horas)



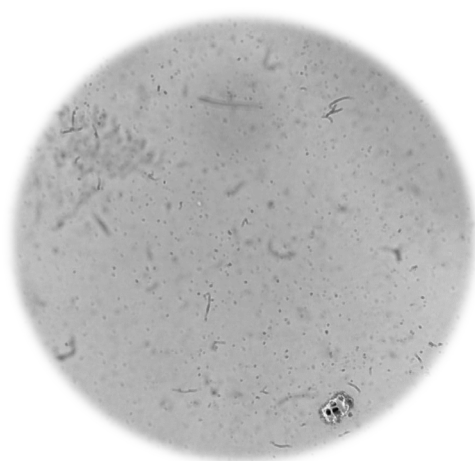
0 horas



6 horas



24 horas



15 horas

Figura 2. Digestión realizada con pepsina

### **8.1.3 Gelificación.**

Se logró gelificación del pregel de bECM esta se presentó después de 30 minutos a 37°C, formando bECMh (Figura3).

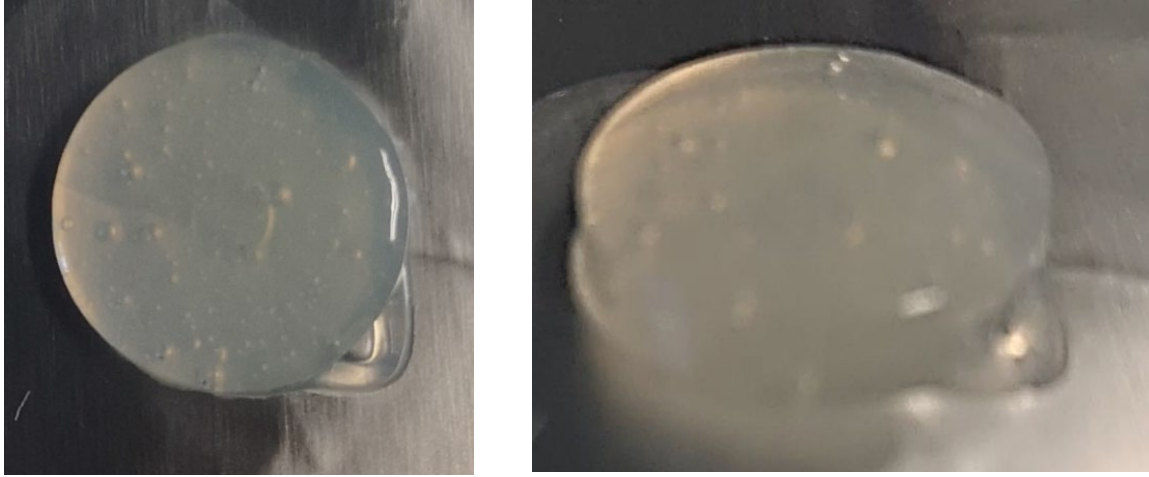


Figura 3. Gelificación del pregel de bECM

#### **8.1.4 Contenido celular y Contenido Proteico**

La Descelularización de bECM y perfil electroforético de proteínas La imagen A de la Figura 4. DBM muestra el contenido celular antes del tratamiento con tripsina/EDTA (flechas negras). B. Las regiones de células libres con ausencia de núcleos y presencia de lagunas acelulares (flechas rojas) son evidentes en bECM después del tratamiento con tripsina/EDTA (Figura 4).

El analizar cualitativamente mostro presencia de colágeno en bECMh, se corrió una SDS-PAGE usando COL-1 como control. El peso molecular (MW) de las bandas de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se calcularon con base en los valores del factor de retención (Rf). bECMh mostró un alto contenido de cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en comparación con COL-1. Portaobjetos histológicos (H&E) aumento 40X, barra de escala 100  $\mu\text{m}$  (Figura 4).

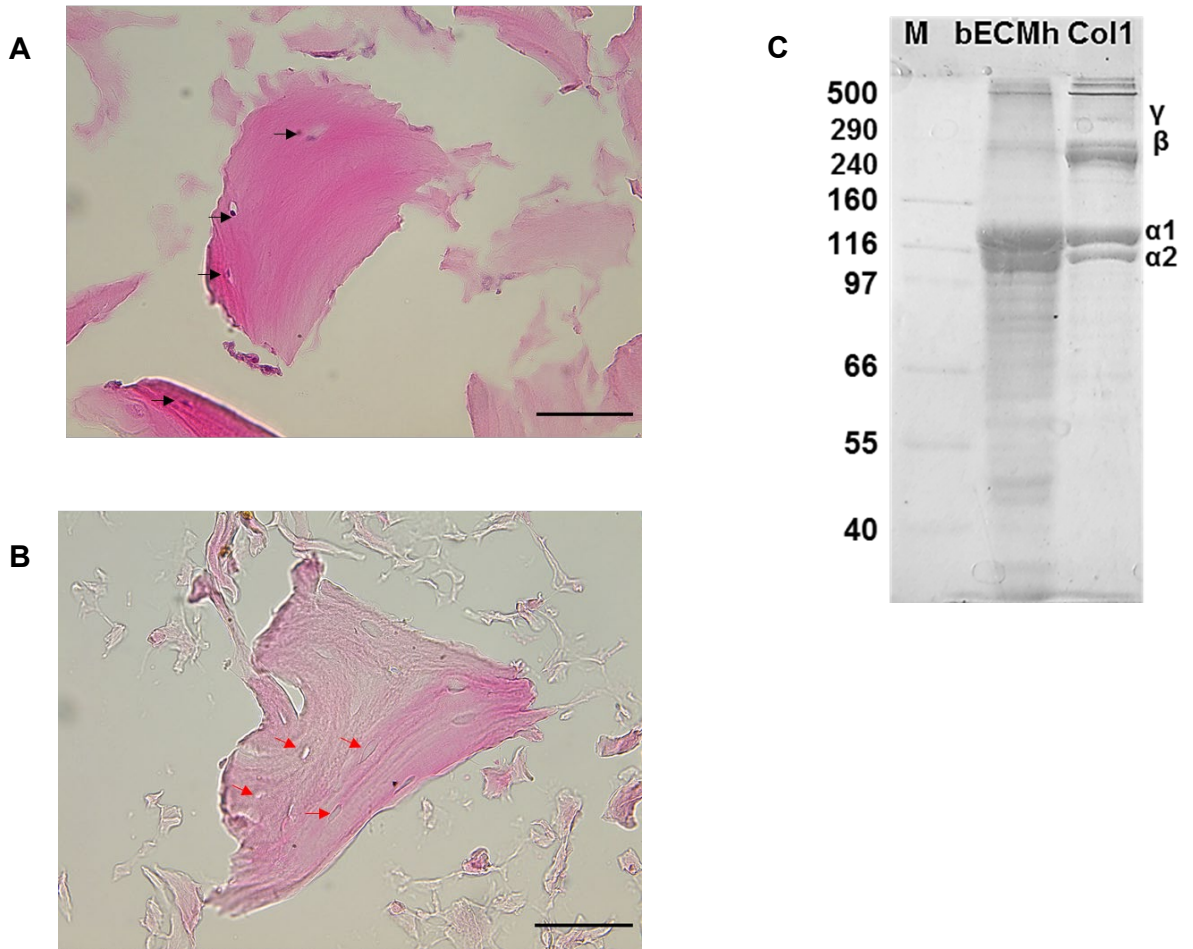


Figura 4. Descelularización A) bECM con células B) bECM sin células. C. presencia de COL tipo 1 en bECM

## **8.2 BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO***

### **8.2.1 Viabilidad celular y citotoxicidad**

El bECMh mostro excelente viabilidad celular a las 24 a 72 h demostrando que en macrófagos, fibroblastos y células Mesenquimales presentan excelente morfología (Figura 5)

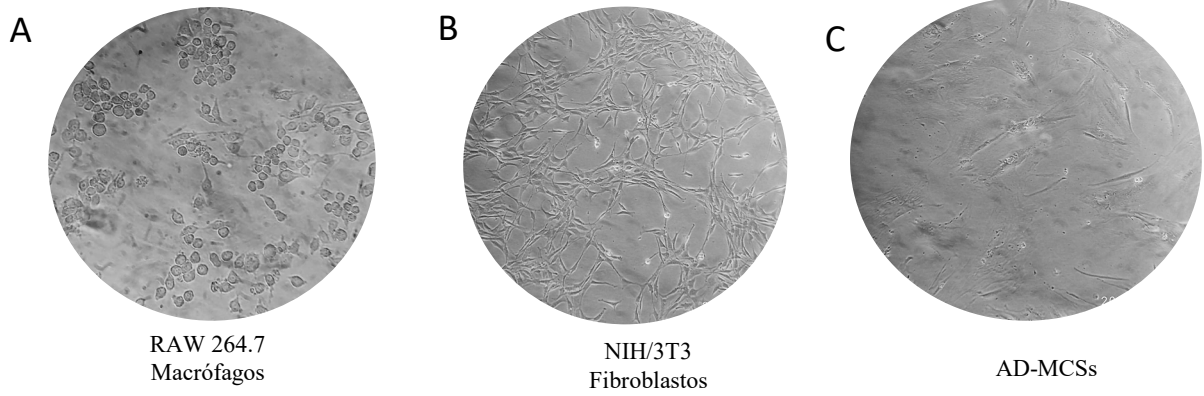


Figura 5. A) macrófagos, B) fibroblastos C) AD-MCS



La proliferación inducida por extracto de bECMh, y DMEM en el ensayo MTT en macrófagos, fibroblastos y AD-MCS (Figura 6). Para evaluar la citotoxicidad, en contacto con macrófagos (D), fibroblastos (E) y AD-MCS (F). Curiosamente, encontramos que los patrones de liberación de LDH fueron similares entre las diferentes líneas celulares en comparación con el grupo DMEM (bECMh frente a DMEM) y solo se encontraron diferencias estadísticas cuando se comparó OD con la liberación de LDH del control (célula lisada,  $p < 0.0001$ ) Figura 6.

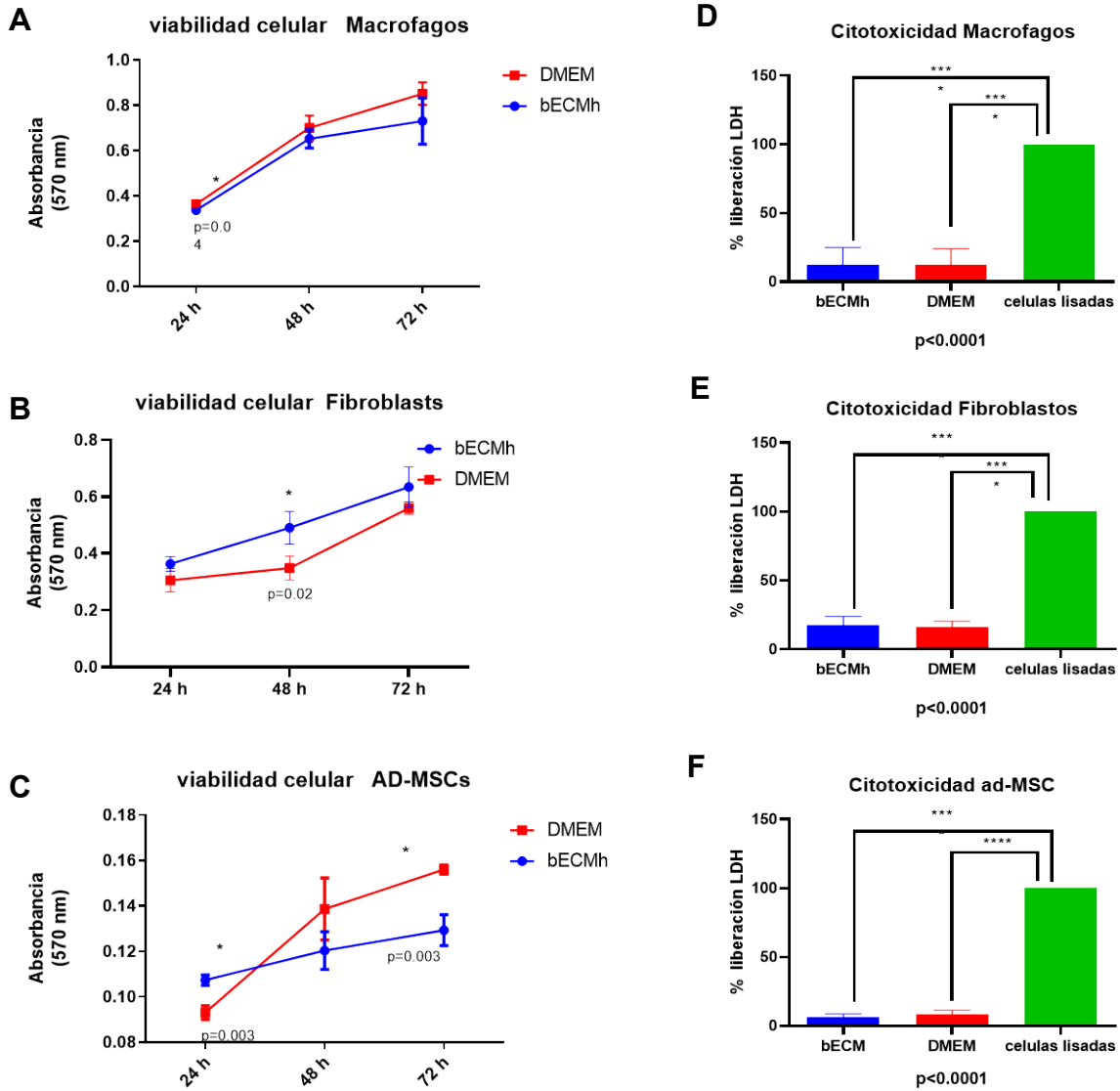


Figura 6. Viabilidad celular de 24 a 72 h A) macrófagos, B) fibroblastos C) AD-MCS. Citotoxicidad celular de 24 a 72 h A) macrófagos, B) fibroblastos C) AD-MCS

### **8.2.2 Ensayo vida/muerte**

La viabilidad celular de macrófagos, fibroblastos y AD-MCS en contacto con el extracto de bECMh mediante microscopía Confocal. La viabilidad celular no mostró diferencias significativas (bECMh vs DMEM) y solo se encontraron diferencias cuando se comparó con el control positivo de muertos (A, B y C) demostrando que bECMh es biocompatibles con múltiples líneas celulares. Además, la morfología celular no se vio comprometida después de la exposición al extracto soluble, como se confirmó mediante microscopía Confocal (D, E y F) Figura 7.

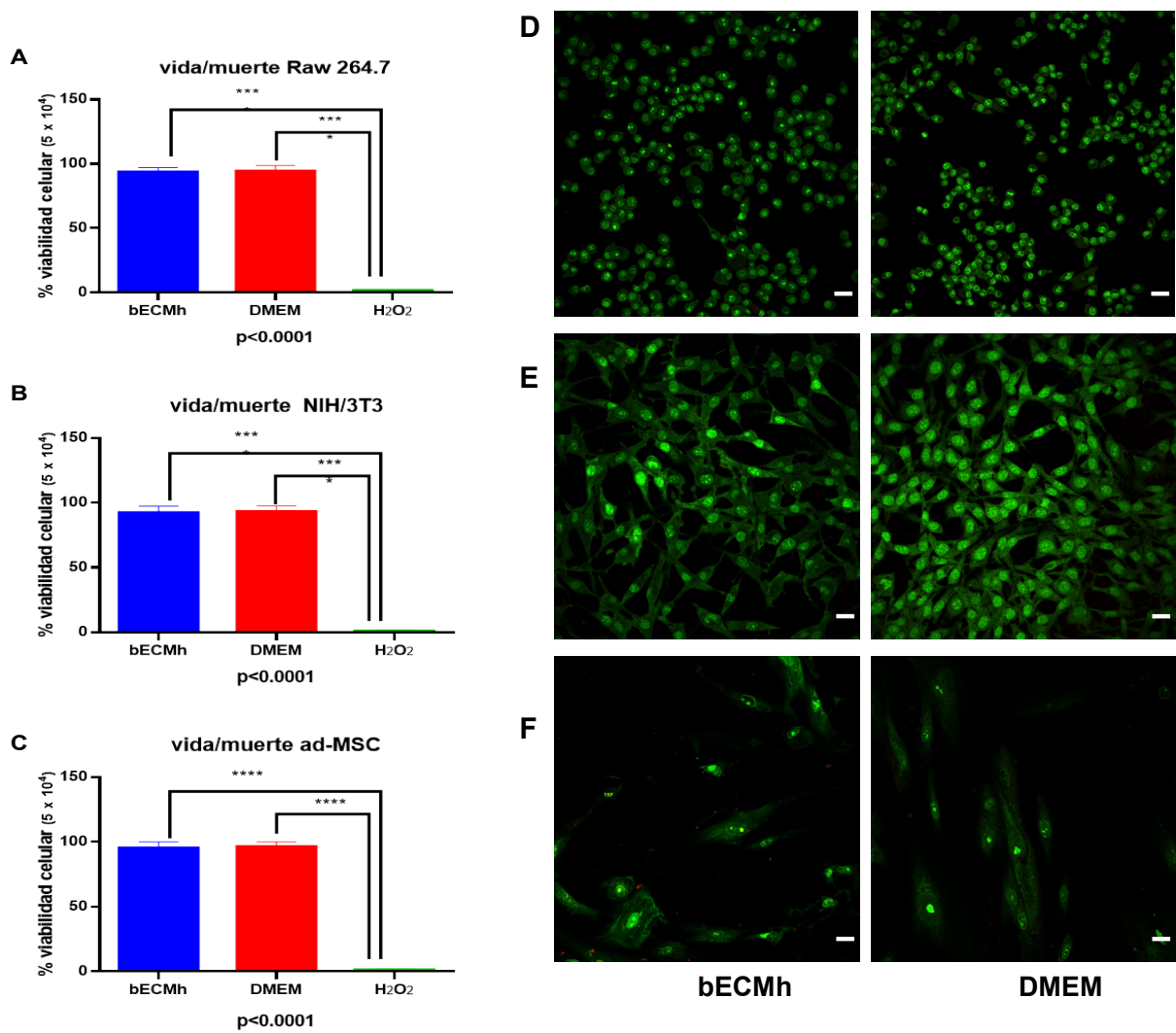


Figura 7. Ensayo vida/muerte D) macrófagos, E) fibroblastos F) AD-MCS

### **8.2.3 Expresión de citocinas**

La producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos expuestos al extracto de bECMh (Figura 10). Encontramos un aumento de las citocinas proinflamatorias IL-6 (A) y TNF- $\alpha$  (B). Para la citocina quimiotáctica MCP-1, también encontramos un aumento (D). Por otro lado, la concentración de IL-12 y concentración de citoquinas antiinflamatorias, IL-10 (C y E) no se vieron alteradas por la exposición al extracto de bECMh. Figura 8.

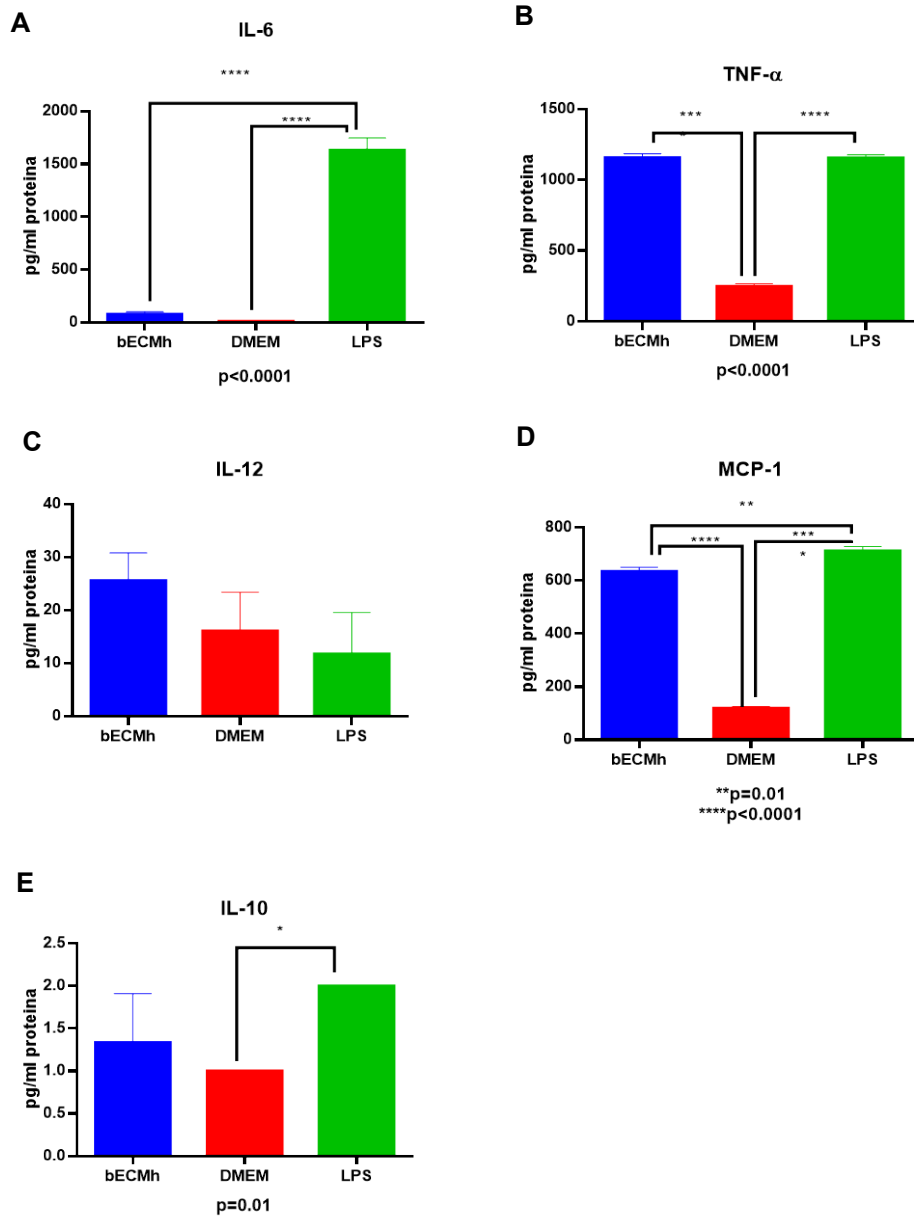


Figura 8. Citocinas proinflamatorias en macrófagos expuestos a bECMh. A) IL-6. B) TNF- $\alpha$  C) IL-12. D). MCP-1 E) IL-10

### **8.3 BIOCOMPATIBILIDAD *IN VIVO***

A las 24 h después de la inyección subcutánea de bECMh en la región dorsal (A, B y C) y cloroformo (D, E y F) como control del daño, se observó tejido de reacción. bECMh permanece estable en un área bien definida (círculo negro), sin ninguna anomalía de la dermis (A). A 10X, se observó baja celularidad dentro del material (B). Un mayor aumento (40X) (recuadro negro) mostró la estructura fibrilar bECMh, con presencia de pocas células polimorfonucleares y similares a fibroblastos. Por el contrario, la inyección de cloroformo causó un daño severo induciendo un hematoma (D). A 10X se aprecia el infiltrado inflamatorio (E) formado por macrófagos de tipo epitelioides intercalados con algunos fibroblastos, así como pequeños vasos sanguíneos en un estroma de tejido conjuntivo denso, como se muestra a 40X (F). Barra de escala 50  $\mu$ m. Figura 9.

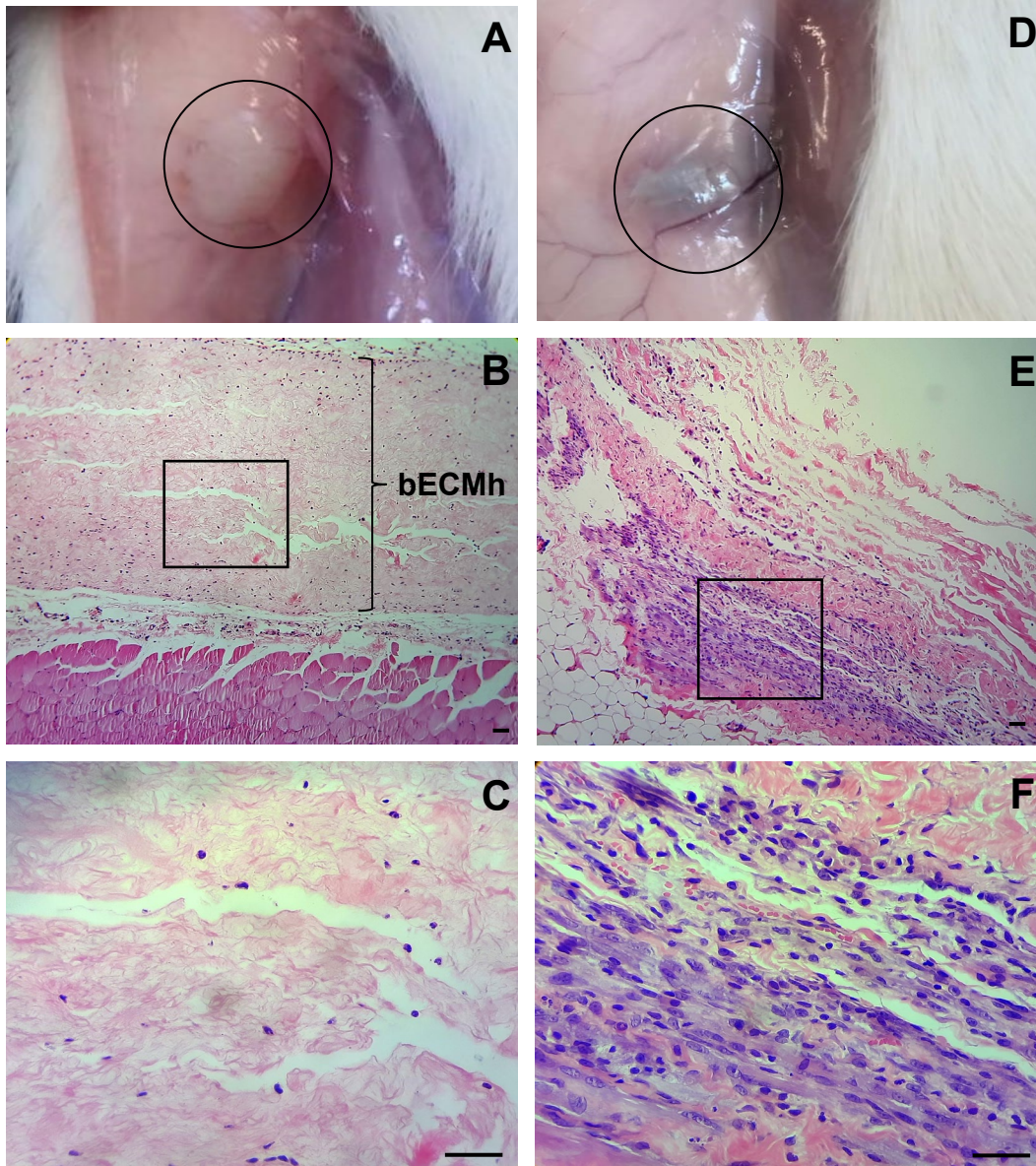


Figura 9. A 24 h después de inyección subcutánea en dorso de bECMh (A, B y C) y cloroformo



## **8.4 EVALUACIÓN DE REGENERACIÓN ÓSEA**

Se realizó cirugía y colocación de los grupos (bECMh y bECMh+HA) y 2 grupos controles positivo (autoinjerto) y negativo (Figura 10) para posteriormente sacrificio a los 6 meses para realizar el análisis macroscópico e histológico.

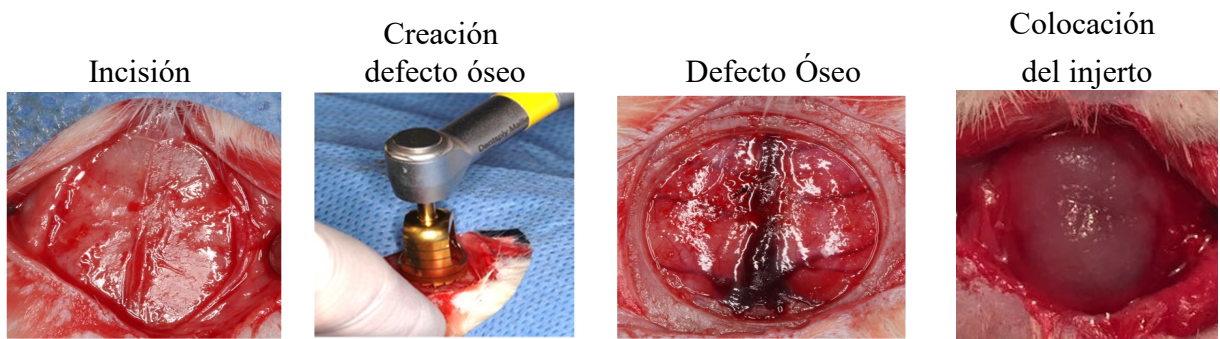


Figura 10. Cirugía en calota de rata Wistar y colocación de bECMh, bECMh/HA y Autoinjerto

En la evaluación macroscópica 0.6 X podemos observar que bECMh es el grupo que logró una regeneración del área del defecto crítico, ya que presentaba una dureza en todo el andamio implantado, seguido del grupo bECMh+HA donde se presentaba áreas sin mineralizar por completo, el grupo control positivo también presentaba áreas sin mineralizar en mayor número y por último el control negativo no presento áreas mineralizadas confirmando con esto que el defecto que se realizó no se puede reparar por sí solo. (Figura 11).

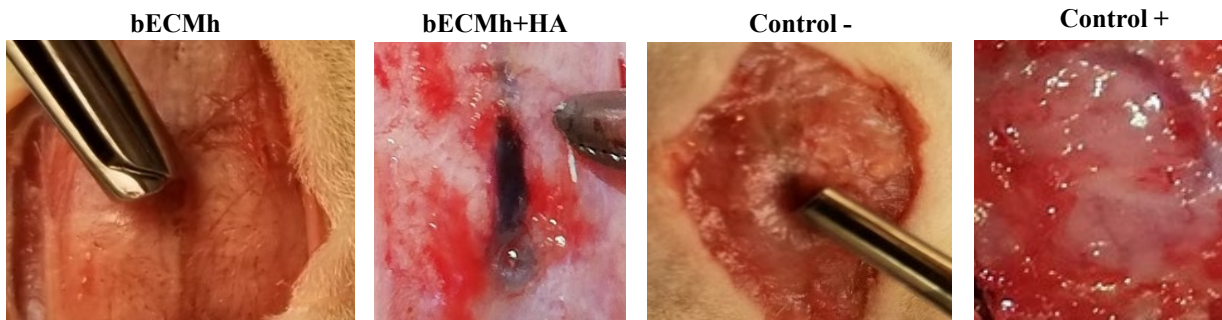
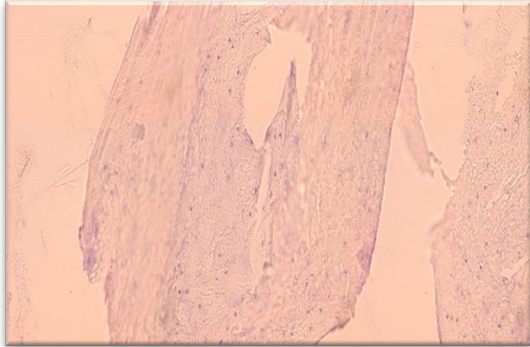


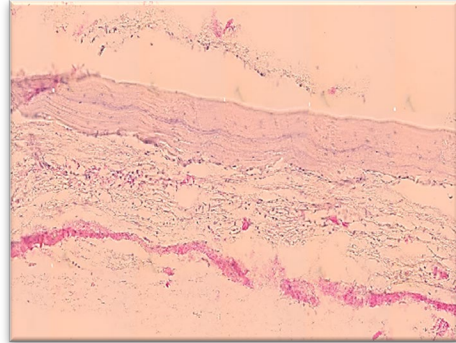
Figura 11. Evaluación macroscópica a 6 meses de bECMh, bECMh/HA, Control positivo y Control

En la evaluación histológica se corroboró lo mostrado por la evaluación macroscópica, mostrando histológicamente que bECMh presenta espacios medulares y osteocitos que lo ocupan, así como también líneas de desarrollo óseo mostrando un hueso maduro, bECMh/HA presentaba de igual osteocitos y líneas de crecimiento de hueso, más sin embargo todavía presentaba tejido conectivo no mineralizado o parcialmente mineralizado, corroborando con esto, que el hueso óseo no se presentaba maduro sino en formación, el Control positivo (autoinjerto), presenta debajo del hueso una área de osteoblastos formando las láminas de desarrollo al igual que áreas de tejido conectivo, el control negativo, presentó fibroblastos y fibras de colágena corroborando que es un tejido conectivo bien estructurado sin formación de tejido óseo ( Figura 12).

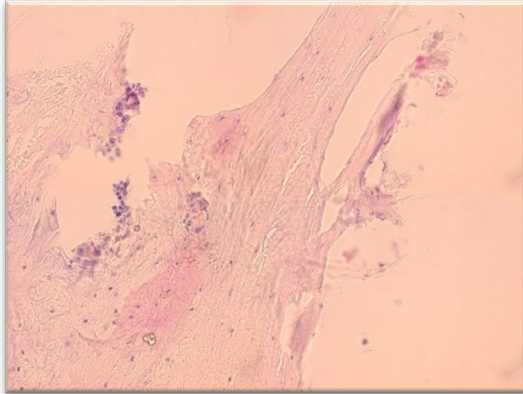
**bECM**



**Control +**



**bECMh+HA**



**Control -**

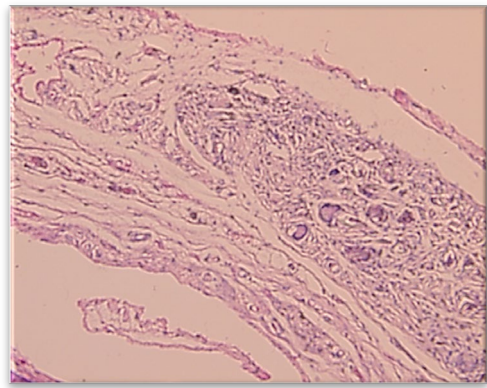


Figura 12. Evaluación histológica a 6 meses de bECMh, bECMh/HA, Control positivo y Control negativo

## 9 DISCUSIÓN

El análisis evidencio la presencia de colágeno tipo 1 en bECMh, mostrando un alto contenido de cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Esto importante ya que el COL tipo 1 ejerce funciones relevantes funcionando como andamio para células óseas, manteniendo la resistencia ósea necesaria (Saito & Marumo, 2015), promoviendo formación ósea y regulando fibrillogénesis del colágeno (Fonseca et al., 2014). Esta característica de bECMh permitiría interacción con otras proteínas colágenas y no colágenas para ensamblar haces de fibrillas y fibras (Varma et al., 2016) que se necesitan para formar un nicho ideal para regeneración de tejidos como se requiere para la deposición de hidroxapatita (HA) (Tavafoghi & Cerruti, 2016).

bECMh mejora proliferación de fibroblastos y no es citotóxico para macrófagos y células mesenquimatosas derivado del tejido adiposo. En el análisis de proliferación inducida por extracto de bECMh, por MTT en macrófagos, fibroblastos y AD-MS. Todas las líneas celulares mostraron mayor viabilidad celular de 24 a 72 h con bECMh y DMEM (Figura 2 A, B y C). Curiosamente, los fibroblastos mostraron una mayor proliferación a 48 h en comparación con el control DMEM ( $p = 0,02$ ) y este comportamiento se mantuvo hasta las 72 h. Mientras tanto, los macrófagos y AD-MS y los macrófagos mostraron mayor comportamiento proliferativo mejorado por los estímulos de DMEM. Estudios previos ya han demostrado que proliferación en diferentes líneas celulares se ve afectada positivamente por la presencia de hidrogeles DBM. Por ejemplo, la proliferación de células craneales primarias de ratón (mCP) se ve reforzada por hidrogel de bDBM digerido y solubilizado con pepsina (Sawkins et al., 2013). La bECMh se obtuvo eliminando todos los componentes celulares facilitando la degradación rápida del andamio y se reemplaza con tejido y células

del huésped funcionales apropiados para el sitio. La presencia de restos celulares se ha relacionado con el perfil de polarización de macrófagos a M1 y el fenotipo proinflamatorio (Brown et al., 2009). En nuestro caso, ausencia de contenido celular puede explicar baja proliferación de macrófagos, evitando activación de los macrófagos y el fenotipo proinflamatorio resultante. Por otro lado, la proliferación de fibroblastos es necesaria para la formación de ECM de novo (Iismaa et al., 2018). La inducción de proliferación de fibroblastos es clave, ya que las células del estroma pueden servir como fuente de factores de crecimiento y citoquinas para apoyar y mejorar regeneración (desJardins-Park et al., 2018). Las terapias actuales celulares se basan en uso de fibroblastos, ECM y tejido placentario crioconservado para inducir la regeneración tisular (Gibbons, 2015). Sin embargo, también se sabe que la falla en la regeneración tisular resulta más comúnmente en inflamación crónica y/o fibrosis (orquestada por fibroblastos), lo que conduce a una neoformación dañada de tejido no funcional (Ugurly & Karaoz, 2020). Esto se puede remediar en condiciones reales, por la presencia de MSC en la zona, ya que tienen un efecto antifibrótico que se relaciona con sus propiedades antiinflamatorias y angiogénicas (Spees et al., 2016). Además, las MCS secretan citocinas que inhiben los fibroblastos (Jackson et al., 2012) y factores como el factor de crecimiento de hepatocitos liberado por las MSC que pueden regular a la baja la expresión de TGF- $\beta$ 1, COL-1 y COL-3 en los fibroblastos, y aumentar la expresión de las metaloproteinasas de la matriz 1, 3 y 13, favoreciendo así la facturación de ECM (Jackson et al., 2012). La combinación de estos tipos de células en el nicho es importante y hay evidencia que muestra que su cohabitación minimiza cicatrización en la zona de regeneración (Yates et al., 2017).

Además, para evaluar la citotoxicidad del extracto de hidrogel de bECM soluble, se incubaron un total de 4 mg/mL en contacto con macrófagos, fibroblastos y AD-MS.



Curiosamente, encontramos que los patrones de liberación de LDH eran similares entre las diferentes líneas celulares en comparación con el grupo DMEM (bECMh frente a DMEM). Las densidades ópticas (OD) fueron más altas en macrófagos ( $0,135 \pm 0,08$  vs  $0,102 \pm 0,04$  OD) en comparación con fibroblastos ( $0,072 \pm 0,03$  vs  $0,067 \pm 0,02$  OD) y AD-MCS ( $0,048 \pm 0,02$  vs  $0,062 \pm 0,01$  OD) y diferencias estadísticas solo se encontraron cuando se comparó la DO con la liberación de LDH del control (célula lisada,  $p < 0,0001$ ).

Dado que la citotoxicidad es una evaluación básica para analizar la biocompatibilidad de los materiales y un parámetro importante para usar un biomaterial como andamio, también evaluamos viabilidad celular de macrófagos, fibroblastos y AD-MSc en contacto con el extracto de bECMh mediante uso del ensayo de viabilidad celular LIFE/DEATH mediante microscopía Confocal. Encontramos un comportamiento muy similar de viabilidad celular no mostró diferencias significativas (bECMh vs DMEM). Los porcentajes de células vivas de macrófagos (93,7 % frente a 94,3 %), fibroblastos (92,3 % frente a 93,3 %) y AD-MSc (95,3 % frente a 96,3 %) (Figura 3 A, B y C) demostraron que bECMh es biocompatible con múltiples líneas celulares. Además, la morfología celular no se vio comprometida después de la exposición al extracto soluble, como se confirmó mediante microscopía Confocal.

Hay una gran cantidad de estudios que muestran que los hidrogeles basados en ECM son citocompatibles y promueven diferenciación y proliferación (Alom et al., 2018; Kočí et al., 2017; Liang et al., 2015). Por ejemplo, se ha demostrado que osteocalcina que se encuentra en ECM es propensa a aumentar tasas de proliferación de las MSC de una manera dependiente de la dosis, mientras que la osteopontina induce a MSC a diferenciarse (Carvalho et al., 2019). En este sentido, el comportamiento de proliferación de las CMM en nuestro

estudio podría estar inducido por los mismos fenómenos, sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

bECMh estimula producción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 en macrófagos. La inducción del perfil de citoquinas es importante para obtener información sobre el impacto de bECMh en promoción de la inflamación. Después de la exposición al extracto de hidrogel en los macrófagos, encontramos un aumento en las citoquinas proinflamatorias IL-6 ( $79,18 \pm 25,68$  vs  $11,10 \pm 0,37$  pg/mL) y TNF- $\alpha$  ( $1157,99 \pm 27,29$  vs  $247,37 \pm 18,91$  pg/ml) (Figura 10). Para la citoquina quimiotáctica MCP-1, también encontramos aumento ( $634.70 \pm 16.38$  vs  $118.96 \pm 6.40$  pg/mL,  $p=0.000$ ). Por otro lado, la concentración de IL-12 ( $25,57 \pm 5,26$  vs  $16,07 \pm 7,39$  pg/mL) y citocina antiinflamatoria, IL-10 ( $43,22 \pm 2,76$  vs  $40,39 \pm 4,55$  pg/mL) no fueron alterados por la exposición al extracto de hidrogel bECM.

En condiciones naturales, una lesión promovería inflamación para aumentar el flujo sanguíneo y permeabilidad vascular, provocando acumulación de líquido, leucocitos y reclutamiento de mediadores inflamatorios, así como regulación al alza de citoquinas proinflamatorias, especialmente IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Bethea et al., 1999; Pineau & Lacroix, 2007) . Existe evidencia que las citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , son necesarias para regeneración del tejido hepático al aumentar tasas mitóticas de manera dependiente de la dosis (Beyer & Stanley, 1990; Mealy & Wilmore, 1991). En este sentido, IL-6 también aumenta en la regeneración del tejido hepático, se sabe que el TNF- $\alpha$  orquesta la producción de IL-6 (Akerman et al., 1992) lo que sugiere que el hidrogel bECMh promueve ambas citoquinas proinflamatorias para iniciar un proceso reparador o regenerativo. Además,

estudios recientes han demostrado que expresión de citocina quimiotáctica MCP-1 es importante en promoción de angiogénesis y vasculogénesis, así como en la regeneración de la vascularización de la pulpa dentada para la regeneración tisular (Akerman et al., 1992; Hayashi et al., 2015).

Hay evidencia de que MCP-1 promueve angiogénesis mediante regulación de VEGF y HIF- $\alpha$  mediante activación del factor de transcripción ETS-1 (Hong et al., 2005). Todo esto sugiere que MCP-1 podría ser un promotor de angiogénesis por activación de factores angiogénicos secundarios por estimulación de bECMh. Después de 24 horas de estimulación con bECMh, la detección nula de la citosina pro inflamatoria IL-12 podría deberse a la rápida respuesta de IL-12 en la cicatrización de heridas, lo que sugiere su degradación antes de las 24 h. (Zhang et al., 2015) encontraron que IL-12 induce un inicio significativamente más rápido y mayor actividad metabólica en respuesta inflamatoria en la piel lesionada durante los primeros momentos de cicatrización de heridas (Li et al., 2015). Además, la falta de IL-12 e IL-23 muestra mayor formación ósea al inhibir indirectamente las células madre Mesenquimales de la médula ósea para diferenciar los osteoblastos *in vivo* (Xu et al., 2016), lo que respalda que IL-12 es fundamental para inicio de inflamación y se metaboliza en las primeras etapas de la inflamación. regeneración. No obstante, se requieren más experimentos para confirmar estos posibles mecanismos.

bECMh actúa como andamio permite colonización de células de tipo fibroblástico del huésped *in vivo*. Después de 24 h de inoculación de bECMh en la subdermis dorsal, el examen macroscópico no mostró daño en los tejidos circundantes (figura 11) y que el hidrogel tenía buena gelificación, ya que permanece estable en un área bien definida, lo que puede ayudar a las células a ocupar su espacio

La evaluación histológica mostró que, de hecho, bECMh mostró una estructura fibrilar de bECMh y estaba poblada por pocas células anfitrionas similares a fibroblastos y pocas células inflamatorias, mientras que, como era de esperar, la inoculación de cloroformo resultó en daño tisular severo con presencia de un fuerte infiltrado inflamatorio, en su mayoría macrófagos de tipo epitelioide, neutrófilos y células tipo fibroblastos (figuras 5 E y F). Estos resultados concuerdan con los mostrados por Výmorný, dado que su hidrogel de matriz extracelular derivado del cordón umbilical humano también favorece colonización de las células huésped en la zona de implantación (Výmorný et al., 2019).

## 10 CONCLUSIONES

La metodología de elaboración de un hidrogel de ECM derivado de hueso bovino (bECMh) se logró con éxito de forma robusta y reproducible. En los estudios *In vitro*, el hidrogel se comporta como un biomaterial dinámico aumentando proliferación de fibroblastos e induce producción de citocinas proinflamatorias, entre como IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 necesarias para regeneración de tejidos. En cuanto a las pruebas de biocompatibilidad *In vivo*, bECMh permite colonización de células de tipo fibroblástico y polimorfonucleares del huésped, sin daño ni inflamación tisular. Estos resultados indican que bECMh es un material biocompatible que podría usarse como andamio mejorando proliferación y permitiendo relleno de defectos óseos para regenerar aún más el tejido perdido.

El bECMh logro completa regeneración del defecto crítico óseo en calota de rata Wistar, y una regeneración parcial en combinación con hidroxiapatita (bECMh+HA), mostrando mejores resultados que el autoinjerto confirmando con esto, que este biomaterial podría ser una solución a los defectos críticos óseos ya sea por traumatismos o enfermedades, más, sin embargo, se requiere de más estudios *in vivo* a diferentes tiempos, para entender el funcionamiento de este biomaterial

## **11 PERSPECTIVAS**

1. Comparar el biomaterial bECMh con un producto comercial validado.
2. Evaluar la regeneración ósea a intervalos iniciales de 1 y 3 meses.
3. Determinar las vías de señalización y procesos celulares involucrados durante el proceso de regeneración ósea, mediante transcriptómica.

## 12 REFERENCIAS

- Abramowitz, P. N., Rankow, H., & Trope, M. (1994). Multidisciplinary approach to apical surgery in conjunction with the loss of buccal cortical plate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 77(5), 502-506.
- Akerman, P., Cote, P., Yang, S. Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G. J., & Diehl, A. M. (1992). Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol*, 263(4 Pt 1), G579-585. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1992.263.4.G579>
- Alom, N., Peto, H., Kirkham, G. R., Shakesheff, K. M., & White, L. J. (2018). Bone extracellular matrix hydrogel enhances osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts and mouse primary calvarial cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 106(2), 900-908. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33894>
- Antonio Campos Muñoz, J. S. E. *Cuerpo, Histología y Medicina. De la Descripción Microscópica a la Ingeniería Tisular*. Real Academia Nac. Medicina. <https://books.google.com.mx/books?id=zJUqDieftIEC>
- Badylak, S. F. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction [Review]. *Semin Cell Dev Biol*, 13(5), 377-383. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324220>
- Badylak, S. F. (2004). Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction [Review]. *Transpl Immunol*, 12(3-4), 367-377. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2003.12.016>
- Badylak, S. F. (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28(25), 3587-3593. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.043>
- Badylak, S. F., Freytes, D. O., & Gilbert, T. W. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function [Review]. *Acta Biomater*, 5(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013>
- Barootchi, S., Tavelli, L., Zucchelli, G., Giannobile, W. V., & Wang, H. L. (2020). Gingival phenotype modification therapies on natural teeth: A network meta-analysis. *J Periodontol*, 91(11), 1386-1399. <https://doi.org/10.1002/jper.19-0715>
- Bethea, J. R., Nagashima, H., Acosta, M. C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A. E., Loor, K., Green, J., & Dietrich, W. D. (1999). Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, 16(10), 851-863. <https://doi.org/10.1089/neu.1999.16.851>
- Beyer, H. S., & Stanley, M. (1990). Tumor necrosis factor-alpha increases hepatic DNA and RNA and hepatocyte mitosis. *Biochem Int*, 22(3), 405-410.
- Bhattacharjee, P., Kundu, B., Naskar, D., Kim, H. W., Maiti, T. K., Bhattacharya, D., & Kundu, S. C. (2017). Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. *Acta Biomater*, 63, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.027>
- Brown, B. N., & Badylak, S. F. (2014). Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Transl Res*, 163(4), 268-285. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.003>
- Brown, B. N., Valentin, J. E., Stewart-Akers, A. M., McCabe, G. P., & Badylak, S. F. (2009). Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds

- with and without a cellular component. *Biomaterials*, 30(8), 1482-1491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.040>
- Campos, F. F., & Traumatología, S. S. E. d. C. O. y. (2010). *Manual de cirugía ortopédica y traumatología*. Editorial Medica Panamericana Sa de. <https://books.google.com.mx/books?id=Ejq5s7eARMoC>
- Carvalho, M. S., Silva, J. C., Cabral, J. M. S., da Silva, C. L., & Vashisith, D. (2019). Cultured cell-derived extracellular matrices to enhance the osteogenic differentiation and angiogenic properties of human mesenchymal stem/stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 13(9), 1544-1558. <https://doi.org/10.1002/term.2907>
- Chaudhuri, O., Cooper-White, J., Janmey, P. A., Mooney, D. J., & Shenoy, V. B. (2020). Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature*, 584(7822), 535-546. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2612-2>
- Cortiella, J., Niles, J., Cantu, A., Brettler, A., Pham, A., Vargas, G., Winston, S., Wang, J., Walls, S., & Nichols, J. E. (2010). Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng Part A*, 16(8), 2565-2580. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0730>
- desJardins-Park, H. E., Foster, D. S., & Longaker, M. T. (2018). Fibroblasts and wound healing: an update. *Regen Med*, 13(5), 491-495. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0073>
- Edgar, L., Altamimi, A., García Sánchez, M., Tamburrinia, R., Asthana, A., Gazia, C., & Orlando, G. (2018). Utility of extracellular matrix powders in tissue engineering. *Organogenesis*, 14(4), 172-186. <https://doi.org/10.1080/15476278.2018.1503771>
- Fitzgerald, R. H., Kaufer, H., & Malkani, A. L. (2004). *Ortopedia*. Panamericana. <https://books.google.com.mx/books?id=z0duOA9ZzBQC>
- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H. J., & Duarte, J. A. (2014). Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med*, 44(1), 37-53. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0100-7>
- Garske, D. S., Schmidt-Bleek, K., Ellinghaus, A., Dienelt, A., Gu, L., Mooney, D. J., Duda, G. N., & Cipitria, A. (2020). Alginate Hydrogels for In Vivo Bone Regeneration: The Immune Competence of the Animal Model Matters. *Tissue Eng Part A*, 26(15-16), 852-862. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2019.0310>
- Giannoudis, P. V., Einhorn, T. A., Schmidmaier, G., & Marsh, D. (2008). The diamond concept--open questions. *Injury*, 39 Suppl 2, S5-8. [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(08\)70010-x](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(08)70010-x)
- Gibbons, G. W. (2015). Grafix(®), a Cryopreserved Placental Membrane, for the Treatment of Chronic/Stalled Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(9), 534-544. <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0647>
- Hayashi, Y., Murakami, M., Kawamura, R., Ishizaka, R., Fukuta, O., & Nakashima, M. (2015). CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. *Stem Cell Res Ther*, 6(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0088-z>
- Holzapfel, B. M., Rudert, M., & Hutmacher, D. W. (2017). [Scaffold-based Bone Tissue Engineering]. *Orthopade*, 46(8), 701-710. <https://doi.org/10.1007/s00132-017-3444-0> (Gerüstträgerbasiertes Knochen-Tissue-Engineering.)



- Hong, K. H., Ryu, J., & Han, K. H. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*, *105*(4), 1405-1407. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3178>
- Honsawek, S., Dhitiseith, D., & Phupong, V. (2006). Effects of demineralized bone matrix on proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. *J Med Assoc Thai*, *89 Suppl 3*, S189-195.
- Hoshiba, T., Lu, H., Kawazoe, N., & Chen, G. (2010). Decellularized matrices for tissue engineering [Review]. *Expert Opin Biol Ther*, *10*(12), 1717-1728. <https://doi.org/10.1517/14712598.2010.534079>
- Hung, B. P., Salter, E. K., Temple, J., Munding, G. S., Brown, E. N., Brazio, P., Rodriguez, E. D., & Grayson, W. L. (2013). Engineering bone grafts with enhanced bone marrow and native scaffolds. *Cells Tissues Organs*, *198*(2), 87-98. <https://doi.org/10.1159/000353696>
- Iismaa, S. E., Kaidonis, X., Nicks, A. M., Bogush, N., Kikuchi, K., Naqvi, N., Harvey, R. P., Husain, A., & Graham, R. M. (2018). Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. *NPJ Regen Med*, *3*, 6. <https://doi.org/10.1038/s41536-018-0044-5>
- Jackson, W. M., Nesti, L. J., & Tuan, R. S. (2012). Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. *Stem Cell Res Ther*, *3*(3), 20. <https://doi.org/10.1186/scrt111>
- Kim, B. S., Kwon, Y. W., Kong, J. S., Park, G. T., Gao, G., Han, W., Kim, M. B., Lee, H., Kim, J. H., & Cho, D. W. (2018). 3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering. *Biomaterials*, *168*, 38-53. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.040>
- Kingsley, D. M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, *8*(2), 133-146.
- Kočí, Z., Výborný, K., Dubišová, J., Vacková, I., Jäger, A., Lunov, O., Jiráková, K., & Kubinová, Š. (2017). Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues. *Tissue Eng Part C Methods*, *23*(6), 333-345. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0089>
- Kropp, B. P. (1998). Small-intestinal submucosa for bladder augmentation: a review of preclinical studies. *World J Urol*, *16*(4), 262-267.
- Kundu, B., Brancato, V., Oliveira, J. M., Correlo, V. M., Reis, R. L., & Kundu, S. C. (2020). Silk fibroin promotes mineralization of gellan gum hydrogels. *Int J Biol Macromol*, *153*, 1328-1334. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.269>
- Lee, E. J., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2014). Biomaterials for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, *42*(2), 323-337. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6>
- Li, J., Bower, A. J., Vainstein, V., Gluzman-Poltorak, Z., Chaney, E. J., Marjanovic, M., Basile, L. A., & Boppart, S. A. (2015). Effect of recombinant interleukin-12 on murine skin regeneration and cell dynamics using in vivo multimodal microscopy. *Biomed Opt Express*, *6*(11), 4277-4287. <https://doi.org/10.1364/boe.6.004277>
- Liang, R., Yang, G., Kim, K. E., D'Amore, A., Pickering, A. N., Zhang, C., & Woo, S. L. (2015). Positive effects of an extracellular matrix hydrogel on rat anterior cruciate ligament fibroblast proliferation and collagen mRNA expression. *J Orthop Translat*, *3*(3), 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2015.05.001>

- Liu, L., Li, D., Wang, Y., Xu, H., Ge, L., & Liang, Z. (2011). Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic (porcine) extracellular matrix (ECM) scaffold for pelvic reconstruction [Comparative Study Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int Urogynecol J*, 22(2), 221-227. <https://doi.org/10.1007/s00192-010-1288-9>
- Ma, K., Titan, A. L., Stafford, M., Zheng, C., & Levenston, M. E. (2012). Variations in chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin/alginate blended hydrogels. *Acta Biomater*, 8(10), 3754-3764. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.028>
- Mealy, K., & Wilmore, D. W. (1991). Tumour necrosis factor increases hepatic cell mass. *Br J Surg*, 78(3), 331-333. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800780320>
- Nakashima, M., & Reddi, A. H. (2003). The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 21(9), 1025-1032. <https://doi.org/10.1038/nbt864>
- Noori, A., Ashrafi, S. J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A., & Webster, T. J. (2017). A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*, 12, 4937-4961. <https://doi.org/10.2147/ijn.S124671>
- Pecora, G., De Leonardis, D., Ibrahim, N., Bovi, M., & Cornelini, R. (2001). The use of calcium sulphate in the surgical treatment of a 'through and through' periradicular lesion. *Int Endod J*, 34(3), 189-197.
- Pineau, I., & Lacroix, S. (2007). Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol*, 500(2), 267-285. <https://doi.org/10.1002/cne.21149>
- Raspall, G. (2006). *Cirugía oral e implantología*. Médica Panamericana. <https://books.google.com.mx/books?id=CNzIos2loHAC>
- Reynolds, M. A., & Bowers, G. M. (1996). Fate of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony defects. *J Periodontol*, 67(2), 150-157. <https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.2.150>
- Roddy, E., DeBaun, M. R., Daoud-Gray, A., Yang, Y. P., & Gardner, M. J. (2018). Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 28(3), 351-362. <https://doi.org/10.1007/s00590-017-2063-0>
- Saito, M., & Marumo, K. (2015). Effects of Collagen Crosslinking on Bone Material Properties in Health and Disease. *Calcif Tissue Int*, 97(3), 242-261. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9985-5>
- Saldin, L. T., Cramer, M. C., Velankar, S. S., White, L. J., & Badylak, S. F. (2017). Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater*, 49, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068>
- Sawkins, M. J., Bowen, W., Dhadda, P., Markides, H., Sidney, L. E., Taylor, A. J., Rose, F. R., Badylak, S. F., Shakesheff, K. M., & White, L. J. (2013). Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta Biomater*, 9(8), 7865-7873. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.029>
- Spees, J. L., Lee, R. H., & Gregory, C. A. (2016). Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*, 7(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0363-7>

- Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. A., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*, 7(10), 1918-1929. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113>
- Su, X., Wang, T., & Guo, S. (2021). Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regen Ther*, 16, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.01.007>
- Tavafoghi, M., & Cerruti, M. (2016). The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *J R Soc Interface*, 13(123). <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0462>
- Tejo-Otero, A., & Ritchie, A. C. (2021). Biological and mechanical evaluation of mineralized-hydrogel scaffolds for tissue engineering applications. *J Biomater Appl*, 36(3), 460-473. <https://doi.org/10.1177/0885328221995425>
- Tsesis, I., Rosen, E., Tamse, A., Taschieri, S., & Del Fabbro, M. (2011). Effect of guided tissue regeneration on the outcome of surgical endodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Endod*, 37(8), 1039-1045. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.016>
- Ugurlu, B., & Karaoz, E. (2020). Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta Histochem*, 122(8), 151634. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151634>
- Urist, M. R. (1973). A bone morphogenetic system in residues of bone matrix in the mouse. *Clin Orthop Relat Res*(91), 210-220.
- Varma, S., Orgel, J. P., & Schieber, J. D. (2016). Nanomechanics of Type I Collagen. *Biophys J*, 111(1), 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.038>
- Vieira, S., Vial, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2017). Nanoparticles for bone tissue engineering. *Biotechnol Prog*, 33(3), 590-611. <https://doi.org/10.1002/btpr.2469>
- von Arx, T., & Alsaeed, M. (2011). The use of regenerative techniques in apical surgery: A literature review. *Saudi Dent J*, 23(3), 113-127. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2011.02.004>
- Voytik-Harbin, S. L., Brightman, A. O., Kraine, M. R., Waisner, B., & Badylak, S. F. (1997). Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem*, 67(4), 478-491.
- Výborný, K., Vallová, J., Kočí, Z., Kekulová, K., Jiráková, K., Jendelová, P., Hodan, J., & Kubinová, Š. (2019). Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair. *Sci Rep*, 9(1), 10674. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47059-x>
- Wang, Y., Rudym, D. D., Walsh, A., Abrahamsen, L., Kim, H. J., Kim, H. S., Kirker-Head, C., & Kaplan, D. L. (2008). In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*, 29(24-25), 3415-3428. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.002>
- Welsch, U., & Sobotta, J. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana. <https://books.google.com.mx/books?id=7zFxo6bmx10C>
- Wu, Y., Zhang, X., Zhao, Q., Tan, B., Chen, X., & Liao, J. (2020). Role of Hydrogels in Bone Tissue Engineering: How Properties Shape Regeneration. *J Biomed Nanotechnol*, 16(12), 1667-1686. <https://doi.org/10.1166/jbn.2020.2997>
- Xing, H., Lee, H., Luo, L., & Kyriakides, T. R. (2020). Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnol Adv*, 42, 107421. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107421>

- Xu, J., Wang, Y., Li, J., Zhang, X., Geng, Y., Huang, Y., Dai, K., & Zhang, X. (2016). IL-12p40 impairs mesenchymal stem cell-mediated bone regeneration via CD4(+) T cells. *Cell Death Differ*, 23(12), 1941-1951. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.72>
- Yates, C. C., Rodrigues, M., Nuschke, A., Johnson, Z. I., Whaley, D., Stolz, D., Newsome, J., & Wells, A. (2017). Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring. *Stem Cell Res Ther*, 8(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0644-9>
- Zhang, Z., Chen, B., Yuan, L., & Niu, C. (2015). Acute cold stress improved the transcription of pro-inflammatory cytokines of Chinese soft-shelled turtle against *Aeromonas hydrophila*. *Dev Comp Immunol*, 49(1), 127-137. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.010>

## 13 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Extracción de hueso esponjoso, B) fragmentos del hueso, C) trituración del hueso, D) extracción de lípidos, E) hueso sin lípidos.....	38
Figura 2. Digestión realizada con pepsina.....	40
Figura 3. Gelificación del pregel de bECM.....	42
Figura 4. Descelularización A) bECM con células B) bECM sin células. C. presencia de COL tipo 1 en bECM .....	44
Figura 5. A) macrófagos, B) fibroblastos C) AD-MCS .....	46
Figura 6. Viabilidad celular de 24 a 72 h A) macrófagos, B) fibroblastos C) AD-MCS. Citotoxicidad celular de 24 a 72 h A) macrófagos, B) fibroblastos C) AD-MCS.....	48
Figura 7. Ensayo vida/muerte D) macrófagos, E) fibroblastos F) AD-MCS .....	50
Figura 8. Citocinas proinflamatorias en macrófagos expuestos a bECMh. A) IL-6. B) TNF- $\alpha$ C) IL-12. D). MCP-1 E) IL-10 .....	52
Figura 9. A 24 h después de inyección subcutánea en dorso de bECMh (A, B y C) y cloroformo .....	54
Figura 10. Cirugía en calota de rata Wistar y colocación de bECMh, bECMh/HA y Autoinjerto.....	56
Figura 11. Evaluación macroscópica a 6 meses de bECMh, bECMh/HA, Control positivo y Control.....	58
Figura 12. Evaluación histológica a 6 meses de bECMh, bECMh/HA, Control positivo y Control negativo .....	60

## 14 ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Cuadro de Variables. ....	24
------------------------------------	----



# Hydrogel-Based Scaffolds in Oral Tissue Engineering

Alfredo Ayala-Ham<sup>1,2</sup>, Jorge López-Gutiérrez<sup>2</sup>, Mercedes Bermúdez<sup>3</sup>, Maribel Aguilar-Medina<sup>3</sup>, Juan Ignacio Sarmiento-Sánchez<sup>4</sup>, César López-Camarillo<sup>5</sup>, Guzman Sanchez-Schmitz<sup>6</sup> and Rosalio Ramos-Payan<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Odontology, Culiacán, Mexico, <sup>2</sup>Faculty of Biology, Culiacán, Mexico, <sup>3</sup>Faculty of Biological and Chemical Sciences, Culiacán, Mexico, <sup>4</sup>Faculty of Engineering, Autonomous University of Sinaloa, Culiacán, Mexico, <sup>5</sup>Autonomous University of Mexico City, Mexico City, Mexico, <sup>6</sup>Boston Children's Hospital and Harvard Medical School, Harvard University, Boston, MA, United States

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Lary D Unsworth,  
University of Alberta, Canada

### Reviewed by:

Zhila Izadi,  
Kermanshah University of Medical  
Sciences, Iran  
Jennifer Patterson,  
Instituto IMDEA Materiales, Spain

### \*Correspondence:

Rosalio Ramos-Payan  
rosaliorp@uas.edu.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Biomaterials,  
a section of the journal  
Frontiers in Materials

**Received:** 12 May 2021

**Accepted:** 15 July 2021

**Published:** 28 July 2021

### Citation:

Ayala-Ham A, López-Gutiérrez J, Bermúdez M, Aguilar-Medina M, Sarmiento-Sánchez JI, López-Camarillo C, Sanchez-Schmitz G and Ramos-Payan R (2021) Hydrogel-Based Scaffolds in Oral Tissue Engineering. *Front. Mater.* 8:708945. doi: 10.3389/fmats.2021.708945

Regenerative therapy in dentistry has gained interest given the complexity to restore dental and periodontal tissues with inert materials. The best approach for regeneration requires three elements for restoring functions of affected or diseased organ tissues: cells, bioactive molecules, and scaffolds. This triad is capable of modulating the processes to replace lost or damaged tissues and restore function, as it has an impact on diverse cellular processes, influencing cell behavior positively to induce the complete restoration of function and morphology of such complex tissues. Hydrogels (HG) have shown advantages as scaffolds as they are soft and elastic three-dimensional (3D) networks formed from hydrophilic homopolymers, copolymers, or macromers. Besides simple or hybrid, HG show chemical, mechanical and biological activities such as the incorporation of cells in their structures, the retention of high-water content which enhances the transportation of cell nutrients and waste, and elastic and flexible characteristics that emulate the native extracellular matrix (ECM). HG can induce changes in cellular processes such as chemotaxis, proliferation, angiogenesis, biomineralization, and expression of specific tissue biomarkers, enhancing the regeneration process. Besides some of them have anti-inflammatory and anti-bacterial effects. This review aims to show an extensive overview of the most used hydrogels in tissue engineering, emphasizing those that are studied for the regeneration of oral tissues, their biological effects, and their clinical implications. Even though most of the HG are still under investigation, some of them have been studied *in vitro* and *in vivo* with outstanding results that may lead to preclinical studies. Besides there are HG that have shown their efficacy in patients such as hyaluronan HG that enhances the healing of gingival tissue.

**Keywords:** hydrogel, oral tissue, dental regeneration, periodontal regeneration, tissue engineering

## INTRODUCTION

In recent years, advances have been made in oral tissue engineering and regenerative dentistry thanks to the growing amount of research in fields such as, stem cell biology, genetic, molecular engineering, and pathologies that affect the dental organ and its supporting tissues (Miran et al., 2016). Nevertheless, regeneration is still ruled by the need for three elements that have the goal of restoring functions of affected or diseased organ tissues (Cavalcanti et al., 2013; Lee et al., 2014; Fukushima et al., 2019): ECM, which serves as a scaffold; active biomolecules, that regulate cell

FULL TEXT LINKS



[Biomed Mater Eng.](#) 2022 Apr 20. doi: 10.3233/BME-211387. Online ahead of print.

## Extracellular matrix hydrogel derived from bovine bone is biocompatible in vitro and in vivo

Alfredo Ayala-Ham <sup>1 2</sup>, Maribel Aguilar-Medina <sup>3</sup>, Josefina León-Félix <sup>4</sup>, José Geovanni Romero-Quintana <sup>3</sup>, Mercedes Bermúdez <sup>5</sup>, Jorge López-Gutiérrez <sup>1</sup>, German Jiménez-Gastélum <sup>1</sup>, Mariana Avendaño-Félix <sup>3</sup>, Erik Lizárraga-Verdugo <sup>3</sup>, Hipólito Castillo-Ureta <sup>1</sup>, César López-Camarillo <sup>6</sup>, Rosalio Ramos-Payan <sup>3</sup>

Affiliations

PMID: 35466925 DOI: [10.3233/BME-211387](https://doi.org/10.3233/BME-211387)

### Abstract

**Background:** Nowadays, biomaterials used as a scaffold must be easy to deliver in the bone defect area. Extracellular matrix (ECM) hydrogels are highly hydrated polymers that can fill irregular shapes and act as bioactive materials.

**Objective:** This work aims to show the effects of ECM hydrogels derived from bovine bone (bECMh) on proliferation, cytotoxicity and expression of pro-inflammatory cytokines in three cells types involved in tissue regeneration, as well as biocompatibility in vivo.

**Methods:** In vitro, we used an extract of bECMh to test it on macrophages, fibroblasts, and adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs). Cell proliferation was measured using the MTT assay, cytotoxicity was measured by quantifying lactate dehydrogenase release and the Live/Dead Cell Imaging assays. Concentrations of IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1 and TNF- $\alpha$  were quantified in the supernatants using a microsphere-based cytometric bead array. For in vivo analysis, Wistar rats were inoculated into the dorsal sub-dermis with bECMh, taking as reference the midline of the back. The specimens were sacrificed at 24 h for histological study.

**Results:** In vitro, this hydrogel behaves as a dynamic biomaterial that increases fibroblast proliferation, induces the production of pro-inflammatory cytokines in macrophages, among which MCP-1 and TNF- $\alpha$  stand out. In vivo, bECMh allows the colonization of host fibroblast-like and polymorphonuclear cells, without tissue damage or inflammation.

**Conclusions:** The results indicate that bECMh is a biocompatible material that could be used as a scaffold, alone or in conjunction with cells or functional biomolecules, enhancing proliferation and allowing the filling of bone defects to its further regeneration.

**Keywords:** Bovine extracellular matrix hydrogel; biocompatibility; biomaterial; demineralized bone matrix; regeneration.

### LinkOut – more resources

Full Text Sources

[IOS Press](#)

Miscellaneous

[NCI CPTAC Assay Portal](#)





EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA



Otorgan el presente

# RECONOCIMIENTO



**A: Alfredo Del Rosario Ayala Ham**

Por su participación con la ponencia: **ESTANDARIZACIÓN DE MODELO DE REGENERACIÓN ÓSEA EN CALOTA DE RATA** en modalidad: **Ponencia** dentro del marco del Quinto Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Sinaloa, celebrado los días 13 y 14 de septiembre de 2017 en la ciudad y puerto de Mazatlán, Sinaloa, México.

  
M.C. Dimpna Gisela Morales González  
Directora de Vinculación  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

  
Dra. Alma Hortencia Olmeda Aguirre  
Rectora  
Universidad Politécnica de Sinaloa





La Universidad Autónoma de Sinaloa



a través de la  
Facultad de Biología

Otorgan la presente

# Constancia

A: MC. ALFREDO DEL ROSARIO AYALA HAM, DR. ROSALÍO RAMOS PAYÁN,  
DRA. ERIKA DE LOURDES SILVA BENÍTEZ, DR. JOSÉ GEOVANNI ROMERO QUINTANA,  
DR. JOSÉ GUILLERMO ROMERO NAVARRO, DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA.

Por su valiosa participación en **Modalidad Cartel Categoría Postgrado**, como parte de las actividades de la **XXIV** semana Nacional de la Ciencia y Tecnología, realizado el día 27 de octubre del presente año en las instalaciones de la Facultad de Biología con el tema:

**EVALUACIÓN DE REGENERACIÓN ÓSEA EMPLEANDO DIFERENTES FORMULACIONES DE MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA Y MATRIZ EXTRACELULAR**

Atentamente

"Vida, Ciencia y Conciencia"

Culiacán Rosales, Sinaloa, octubre de 2017

*Vicente Olimón Andulón*

**Dr. Vicente Olimón Andulón**

Director de la Facultad de Biología



**La crisis del agua:  
problemas y soluciones**

MÉXICO



CONACYT



MÉXICO  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS



CONACYT  
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS



SINALOA  
GOBIERNO DEL ESTADO

INAPI  
INSTITUTO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN



# La crisis del agua: problemas y soluciones

EL INSTITUTO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

OTORGA EL PRESENTE

# RECONOCIMIENTO

al M.C. Alfredo del Rosario Ayala Ham  
Conferencista

en el marco de la XXIV Semana  
Nacional de Ciencia y Tecnología.

Diciembre 2017.



Dr. Carlos Karza Quiñones  
Director General del Instituto de Apoyo a  
la Investigación e Innovación



San Nicolás de los Garza, Nuevo León, a 18 de septiembre de 2020

**Autores del trabajo libre**

Alfredo del Rosario Ayala Ham, Maribel Aguilar Medina, Rosalío Ramos Payán, Juan Ignacio Sarmiento Sánchez, Gloria Yolanda Castro Salazar, José Geovanni Romero Quintana

A nombre del Comité Científico del VII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y V Simposio Nacional de Microbiología Aplicada 2020, se extiende la presente para notificarle que su trabajo titulado:

Biocompatibilidad de un hidrogel de matriz ósea y en combinación con hidroxiapatita sobre macrófagos

ha sido revisado y **Aceptado** para su presentación en la modalidad Oral