



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## DESARROLLO DE PROTOTIPOS DE SOPORTES TRIDIMENSIONALES A BASE DE COLÁGENO TIPO I E HIDROXIAPATITA PARA REGENERACIÓN ÓSEA

MIGUELÁNGEL MONCAYO DONOSO

2019



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

**DESARROLLO DE PROTOTIPOS DE SOPORTES TRIDIMENSIONALES A  
BASE DE COLÁGENO TIPO I E HIDROXIAPATITA PARA REGENERACIÓN  
ÓSEA**

Miguelangel Moncayo Donoso

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA




**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Universidad de Málaga  
Facultad de Ciencias  
Doctorado en Biotecnología Avanzada**

**Julio de 2019**



AUTOR: Miguelangel Moncayo Donoso

 <http://orcid.org/0000-0001-9647-0987>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)

# **DESARROLLO DE PROTOTIPOS DE SOPORTES TRIDIMENSIONALES A BASE DE COLÁGENO TIPO I E HIDROXIAPATITA PARA REGENERACIÓN ÓSEA**

Miguelangel Moncayo Donoso

## **Tesis doctoral presentada para optar al título de:**

Doctor en Ciencias Biomédicas  
Doctor en Biotecnología Avanzada

### **Directores:**

Martha Raquel Fontanilla Duque, Ph.D.  
UNAL - Facultad de Ciencias – Departamento de Farmacia

José Becerra Ratia, Ph.D.  
UMA - Facultad de Ciencias – Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

### **Codirectores:**

Diego Alexander Garzón Alvarado, Ph.D.  
Facultad de Ingeniería – Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica

Rick Visser  
UMA - Facultad de Ciencias – Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

### **Grupos de Investigación Asociados:**

Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos - GTIT  
Grupo de Mecanobiología de Órganos y Tejidos  
Laboratorio de Bioingeniería y Regeneración Tisular - LABRET

Julio de 2019



*A mi familia, porque sin ellos  
el camino no tendría sentido.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis abuelos Víctor Hugo y Alba que ya no se encuentran conmigo, porque su recuerdo me inspira y me llena de alegría cada día. A mis abuelos Martha y José Félix porque gran parte de lo que hoy soy ha sido gracias a la influencia positiva que han tenido a lo largo de mi vida.

A mis padres Janeth y Tomás porque siempre me han apoyado y cada día me hacen sentir como la persona más afortunada, porque están conmigo sin importar si he caído.

A mi hermano y el resto de mi familia que siempre me han demostrado su apoyo incondicional.

A Camila Eraso Rendón porque siempre fue mi apoyo incondicional, sencillamente no habría llegado a este punto sin su presencia en mi vida.

A la profesora Martha Raquel Fontanilla que me acogió en su grupo y me brindó la oportunidad de crecer académica y personalmente. A mis compañeros del Grupo de Ingeniería de Tejidos (GTIT) que no tuvieron reparos en compartir su conocimiento conmigo.

Al profesor Diego Garzón y a los integrantes de Grupo de Mecanobiología de Órganos y Tejidos porque desde el principio me han acogido y han enriquecido enormemente mi proceso profesional.

Al profesor José Becerra Ratia que ha hecho posible mi estancia en Málaga en el Grupo de Bioingeniería y Regeneración Tisular (LABRET) y me ha brindado la increíble experiencia de trabajar con sus integrantes.

A Rick Visser y Gustavo Rico por guiarme y compartir sus conocimientos que han sido invaluable para la culminación de este trabajo de investigación.

A COLCIENCIAS y la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional (DIB-UNAL) porque sin el apoyo financiero, este proyecto no hubiese sido posible.

*Muchas gracias a todos.....*



## RESUMEN

El hueso es uno de los tejidos de mayor demanda para trasplante a nivel mundial, representando cerca de 2,2 millones de injertos anualmente. Por medio de la ingeniería de tejidos ósea (BTE) se han desarrollado estrategias que permiten la regeneración del tejido, sin embargo, el desarrollo de un sustituto óseo que tenga las características estructurales y funcionales del hueso nativo sigue siendo un desafío. En este trabajo se propuso el desarrollo de prototipos de soportes bioinspirados en la composición y en la microestructura del hueso. Estos soportes se caracterizaron microestructural, mecánica, biológica y fisicoquímicamente, y su potencial osteoconductor se probó *in vitro* mediante la siembra y diferenciación de células madre mesenquimales asiladas de médula ósea de rata (rBM-MS) y células madre mesenquimales humanas asiladas de gelatina de Wharton (hWJ-MS), e *in vivo* mediante un modelo ectópico intramuscular en rata. Los soportes desarrollados (*UC: colágeno unidireccional; MC: colágeno multidireccional; UCH: colágeno/hidroxiapatita unidireccional y MCH: colágeno/hidroxiapatita multidireccional*) presentaron una microestructura porosa interconectada con una porosidad >90% y poros >300  $\mu\text{m}$ . Mecánicamente los soportes unidireccionales (*UC y UCH*) fueron más resistentes y elásticos en comparación con los multidireccionales (*MC y MCH*). *In vitro*, las MS proliferan y se diferencian a un linaje osteoblástico en presencia de factores osteogénicos. *In vivo*, se observó la formación ectópica de hueso orientado axialmente en soportes unidireccionales. Cuantitativamente la cantidad de hueso formado fue mayor en soportes unidireccionales en combinación con los factores BMP-2+VEGF. Los soportes unidireccionales desarrollados en este trabajo podrían representar una nueva alternativa en la BTE para la regeneración de tejido óseo con propiedades microestructurales y funcionales similares a las del hueso cortical nativo.

**Palabras clave:** Colágeno, hidroxiapatita, unidireccional, multidireccional, tejido óseo, ingeniería de tejidos.

## ABSTRACT

Bone is one of the most transplanted tissues worldwide, representing about 2,2 million of grafts annually. Bone tissue engineering (BTE) has developed strategies to achieve the tissue regeneration, however, the development of a bone substitute able to regenerate the both structural and functional characteristics of native bone remains a challenge. In this work the development of bioinspired scaffolds based in the composition and the microstructure of native bone was developed. A microstructural, mechanical, physicochemical and biological characterization was made. The osteoconductive potential of scaffolds was tested *in vitro* through the seeding and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBM-MSK) and human Wharton jelly mesenchymal stem cells (hWJ-MSK), and *in vivo* through the implantation intramuscularly in a rat model. The scaffolds named: "*UC: unidirectional collagen; MC: multidirectional collagen; UCH: unidirectional collagen/hydroxyapatite and MCH: multidirectional collagen/hydroxyapatite*" had a porous interconnected microstructure with a porosity >90% and pore size >300µm. Mechanically, unidirectional scaffolds (*UC* and *UCH*) were more resistant and elastic in comparison with multidirectional ones (*MC* and *MCH*). *In vitro*, MSK proliferate and differentiate into an osteoblastic lineage in the presence of osteogenic factors. *In vivo*, the ectopic bone formation oriented axially in unidirectional scaffolds was observed. Quantitatively, the amount of bone formed was greater in unidirectional scaffolds in combination with the BMP-2 + VEGF factors in comparison to the multidirectional ones.

**Key words:** Collagen, hydroxyapatite, unidirectional, multidirectional, bone tissue, tissue engineering.



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ECUACIONES</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>17</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
<b>3.1 HIPÓTESIS</b>	<b>43</b>
<b>3.2 OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>3.2.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>43</b>
<b>3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>43</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>121</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>125</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema que ilustra el proceso de osificación intramembranosa.....	19
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del proceso de osificación endocondral. ....	21
<b>Figura 3.</b> Ilustración de los diferentes tipos de células óseas. El hueso está formado por diferentes tipos de células. ....	24
<b>Figura 4.</b> Esquema de la organización estructural jerárquica del hueso.....	25
<b>Figura 5.</b> Fotografías de la estructura ósea jerárquica en diferentes escalas. ....	26
<b>Figura 6.</b> Ilustración del proceso de reparación de fracturas indirecto. ....	30
<b>Figura 7.</b> Esquema del principio fundamental de la TE. ....	31
<b>Figura 8.</b> Imágenes de los productos comerciales para regeneración ósea.....	33
<b>Figura 9.</b> Esquema de la estructura fibrilar del colágeno.. ....	35
<b>Figura 10.</b> Esquema del arreglo atómico en la celda unitaria hexagonal de la HAp.....	36
<b>Figura 11.</b> Ilustración de la organización estructural del hueso.....	46
<b>Figura 12.</b> Esquema de la prueba de concepto para la aplicación de soportes multi- y unidireccionales en defectos de tamaño crítico de radio de conejo Nueva Zelanda. ...	46
<b>Figura 13.</b> Esquema que muestra el diseño de soportes de Col-I y Col-I/HAp basados en la direccionalidad de las fibras de colágeno del hueso cortical y trabecular. ....	47
<b>Figura 14.</b> Ilustración de los moldes de teflón usados para la elaboración de los soportes laminares. ....	51
<b>Figura 15.</b> Esquema de implantación de los soportes en el modelo ectópico en rata. ....	64
<b>Figura 16.</b> Imágenes SEM de hidroxiapatita aislada de hueso cortical bovino obtenida por el método de hidrólisis alcalina.....	69
<b>Figura 17.</b> Difractograma de DRX de la HAp obtenida de hueso cortical bovino. ....	71
<b>Figura 18.</b> Espectro de FTIR de la HAp obtenida de hueso cortical bovino.....	72
<b>Figura 19.</b> Obtención y caracterización de dispersión coloidal de colágeno tipo I.....	73
<b>Figura 20.</b> Fotografías de los soportes fabricados por el método de congelamiento- liofilización.....	75
<b>Figura 21.</b> Imágenes de ESEM que muestran las características microestructurales de los soportes. ....	77
<b>Figura 22.</b> Imágenes de FESEM de soportes de fibrillas de Col-I y fibras de Col-I recubiertas con HAp. ....	78
<b>Figura 23.</b> Box-plot del tamaño de poro de los soportes.....	80
<b>Figura 24.</b> Box-plot de la porosidad de los soportes. ....	81
<b>Figura 25.</b> Gráfica que muestra la resistencia a la tracción de los soportes. ....	83
<b>Figura 26.</b> Gráfica que muestra el Módulo de Young de de los soportes.....	84
<b>Figura 27.</b> Gráfica del porcentaje de hinchamiento de los soportes.....	89
<b>Figura 28.</b> Gráfica de las curvas del porcentaje de degradación de los soportes. ....	86
<b>Figura 29.</b> Gráfica de la evaluación de la citotoxicidad de los soportes mediante ensayo MTT de acuerdo al estándar para dispositivos médicos – ISO 10993-5. ....	87
<b>Figura 30.</b> Gráfica que muestra los espectros de FTIR de los soportes. ....	88
<b>Figura 31.</b> Imágenes de estereoscopia de fluorescencia que muestran la capacidad de adhesión y colonización de las rBM-MSc tratadas con Cell Tracker Green a los soportes. ....	91

<b>Figura 32.</b> Gráfica de la capacidad de adhesión de las rBM-MSC a los soportes. ....	92
<b>Figura 33.</b> Gráfica de las curvas de proliferación de rBM-MSC en los soportes. ....	93
<b>Figura 34.</b> Gráfica del efecto de las citoquinas FGF-2 y BMP-2 en la diferenciación de rBM-MSC en monocapa. ....	95
<b>Figura 35.</b> Gráfica del efecto de las citoquinas VEGF y BMP-2 en la diferenciación de rBM-MSC en monocapa. ....	97
<b>Figura 36.</b> Gráfica de la diferenciación de rBM-MSC sembradas en los soportes. ....	100
<b>Figura 37.</b> Fotografías de secciones histológicas teñidas con H&E de implantes ectópicos después de 21 días en el modelo animal en rata. ....	104
<b>Figura 38.</b> Gráfica de la cuantificación del calcio obtenido de implantes ectópicos después de 21 días. ....	106
<b>Figura 39.</b> Graficas de citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie característicos de MSC en hWJ-MSC. ....	108
<b>Figura 40.</b> Fotografías de de hWJ-MSC diferenciadas a linajes adipogénico, osteogénico, y condrogénico in vitro. ....	110
<b>Figura 41.</b> Imágenes de ESEM que muestran la la capacidad de adhesión de las hWJ-MSC a la superficie de los soportes. ....	111
<b>Figura 42.</b> Imágenes de microscopia de fluorescencia que muestran la capacidad de adhesión y migración de las hWJ-MSC en los soportes. ....	112
<b>Figura 43.</b> Curvas de proliferación de hWJ-MSC sembradas en los soportes. ....	113
<b>Figura 44.</b> Imágenes de secciones histológicas teñidas con H&E de los soportes sembrados con hWJ-MSC en condiciones de cultivo estándar. ....	114
<b>Figura 45.</b> Imágenes de secciones histológicas teñidas con H&E de los soportes sembrados con hWJ-MSC en condiciones de cultivo osteogénicas. ....	115
<b>Figura 46.</b> Imágenes de secciones histológicas teñidas con Rojo de Alizarina de los soportes sembrados con hWJ-MSC en condiciones de cultivo estándar. ....	116
<b>Figura 47.</b> Imágenes de secciones histológicas teñidas con Rojo de Alizarina de los soportes sembrados con hWJ-MSC en condiciones de cultivo osteogénico. ....	117
<b>Figura 48.</b> Fotografías de soportes teñidos con con Rojo de Alizarina para la evaluación de mineralización. ....	118
<b>Figura 49.</b> Grafica de la cuantificación de la mineralización después de 28 días de cultivo en medio de crecimiento y en medio osteogénico. ....	120
<b>Figura 50.</b> Esquema que muestra el diseño para aplicación de soportes de Col-I y Col-I/HAp en defectos de tamaño crítico en huesos largos. ....	124

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades mecánicas del hueso. ....	38
<b>Tabla 2.</b> Resumen tratamiento de hidrolisis alcalino para el aislamiento y purificación de hidroxiapatita de origen bovino (Tomada de [99]).....	49
<b>Tabla 3.</b> Descripción del proceso de purificación de Col-I. Tomada de [92]. ....	49
<b>Tabla 4.</b> Número de soportes a usar por tipo (UC; MC) y por tratamiento (C-; BMP-2; VEGF; BMP-2/VEGF) para el grupo 1: Histología. ....	63
<b>Tabla 5.</b> Número de soportes a usar por tipo (UC; MC) y por tratamiento (C-; BMP-2; VEGF; BMP-2/VEGF) para el grupo 2: Cuantificación de calcio.....	63
<b>Tabla 6.</b> Carga de citoquinas en los soportes T1 (carga en tiempo 1) y T2 (carga en tiempo 2).....	63
<b>Tabla 7.</b> Pasos del proceso de decalcificación. Los implantes que no contenían BMP-2 no se sometieron al decalcificador. ....	65
<b>Tabla 8.</b> Pasos del proceso deshidratación e inclusión de los implantes.....	65
<b>Tabla 9.</b> Protocolo de tinción con H&E.....	66

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1: Porcentaje de porosidad.....	52
Ecuación 2: Tamaño de poro .....	53
Ecuación 3: Porcentaje de degradación .....	54
Ecuación 4: Viabilidad celular .....	55
Ecuación 5: Porcentaje de hinchamiento .....	56
Ecuación 6: Medición de ALP .....	61
Ecuación 7: Cuantificación de contenido de calcio.....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS

### A

- ALP:** Fosfatasa alcalina  
**ADSC:** Células madre mesenquimales de tejido adiposo  
**ANOVA:** Análisis de varianza  
**ATR:** Celda de reflectancia total atenuada

### B

- BTE:** Ingeniería de tejidos ósea  
**BMP:** Proteína morfogenética ósea  
**BSP:** Sialoproteína ósea  
**BM-MSC:** Células madre mesenquimales de médula ósea  
**BIONAND:** Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología  
**BSA:** Albúmina de suero bovino

### C

- Col-I:** Colágeno tipo I  
**COP:** Centro primario de osificación  
**CSO:** Centro secundario de osificación  
**OPN:** Osteopontina  
**OCN:** Osteocalcina

### D

- DPSC:** Células madre mesenquimales de pulpa dental  
**DRX:** Difracción de rayos-X  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico

### E

- EICH:** Enfermedad de injerto contra huésped

**ESEM:** Microscopía electrónica de barrido ambiental

**EEB:** Encefalopatía espongiiforme bovina

## F

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos

**FGF:** Factores de crecimiento fibroblástico

**FTIR:** Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier

## G

**GTIT:** Grupo de trabajo en ingeniería de tejidos

**GTA:** Glutaraldehído

**GFP:** Proteína fluorescente verde

## H

**hWJ-MSC:** Células madre mesenquimales humanas de gelatina de Wharton

**HAp:** Hidroxiapatita

**HSC:** Células hematopoyéticas

**hPL:** Plaquetas humanas

**H&E:** Hematoxilina y eosina

**HCL:** Ácido clorhídrico

**hADSC:** Células madre mesenquimales humanas aisladas de tejido adiposo

## I

**IGF:** Factor de crecimiento similar a la insulina

**IL:** Interleuquina

**ICDBIS:** Instituto de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud

## M

**MC:** Colágeno multidireccional

**MCH:** Colágeno-hidroxiapatita multidireccional

**MSC:** Células madre mesenquimales  
**MEC:** Matriz extracelular ósea  
**MDSC:** Células madre mesenquimales de musculo

## O

**OC:** Osteoclastos  
**OB:** Osteoblastos  
**Osx:** Osterix  
**OCN:** Osteocalcina  
**OPG:** Osteoprotegerina  
**OMS:** Organización Mundial de Salud

## P

**PLA:** ácido poliláctico  
**PGA:** ácido poliglicólico  
**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
**PBS:** Tampón fosfato salino

## R

**rBM-MSc:** Células madre mesenquimales de médula ósea de rata  
**RPM:** Revoluciones por minuto  
**RA:** Rojo de alizarina

## S

**SD:** Desviación estándar  
**SEM:** Microscopía electrónica de barrido  
**SFB:** Suero fetal bovino

## T

**TE:** Ingeniería de tejidos  
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa



**TR:** Tiempo de reacción

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TP:** Tamaño de poro

## U

**UC:** Colágeno unidireccional

**UCH:** Colágeno-hidroxiapatita unidireccional

**UBC-**MSC**:** Células madre mesenquimales de cordón umbilical

**UNAL:** Universidad Nacional de Colombia

## V

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

## W

**WJ:** Gelatina de Wharton

# 1. INTRODUCCIÓN

El hueso es uno de los tejidos más trasplantados a nivel mundial; anualmente se realizan cerca de 2,2 millones de injertos óseos en el mundo [1]. Esta alta incidencia se debe al incremento de infecciones, desarrollo de tumores y pérdida de tejido por envejecimiento y desordenes metabólicos, lo que ha convertido a la regeneración ósea en centro de atención para la investigación biomédica [2]. Las terapias actuales incluyen autoinjertos, aloinjertos y sustitutos artificiales [3]. El autoinjerto sigue siendo la técnica de elección en procedimientos de remplazo de tejido óseo, obteniendo una alta tasa de éxito debido a su biocompatibilidad. Sin embargo, presenta limitaciones, entre las cuales la baja disponibilidad del injerto, morbilidad y dolor en el paciente constituyen algunas de las más importantes [4]. Los aloinjertos, por otra parte, pueden resultar en rechazo inmunológico [5] y presentan baja osteoinducción debido a que los tratamientos necesarios para su conservación eliminan el agua del tejido, reducen la resistencia mecánica y destruyen las células ontogénicas [6]. La ingeniería de tejidos (TE, *por sus siglas en inglés*), la cual busca promover la regeneración tisular mediante el uso sinérgico de biomateriales, células y factores de crecimiento, ha desarrollado *sustitutos artificiales* que eliminan los inconvenientes de los tratamientos convencionales [7]. Para producir un sustituto artificial de un tejido, es necesario conocer la composición química, propiedades físicas y características estructurales del tejido que se quiere sustituir [8].

El hueso está constituido por materia orgánica (30%), inorgánica (60%) y agua (10%) [9]. La primera está representada en un 90% por colágeno tipo I (Col-I), constituyente más abundante de la matriz extracelular ósea que cumple una función estructural, de señalización, regula la adhesión celular y promueve la diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC) a un linaje osteogénico [10]. El 10% restante está constituido por proteínas diferentes al colágeno y proteoglicanos que juegan papeles críticos en la homeostasis del tejido, regulando la fibrillogénesis del colágeno, la mineralización de la matriz, la señalización celular y el secuestro y liberación de factores de crecimiento y morfógenos [10]. La fase inorgánica del hueso está constituida principalmente por hidroxiapatita (HAp), un biocerámico formado por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno que se deposita en las fibras colágenas proporcionando dureza, además de servir como reservorio de iones para la homeostasis del hueso [11][12][9][13].



Microestructuralmente el hueso se caracteriza por tener una porosidad del 70-90%, internamente (hueso trabecular), mientras que la parte externa (hueso cortical) presenta porcentajes de porosidad del 10-30%. Esta diferencia influye en las propiedades mecánicas de cada tipo de hueso, siendo el hueso compacto el que soporta la mayoría de las fuerzas a las que está sometido. La compleja organización microestructural y las propiedades mecánicas únicas del hueso lo convierten en un desafío para la TE en el desarrollo de un “sustituto óseo ideal”. Algunos parámetros a considerar para el desarrollo exitoso de un soporte óseo incluyen: 1) combinación de diferentes tamaños de poro (macroporos con un diámetro superior a 100µm y microporos, con un diámetro inferior a 20µm); 2) porosidad interconectada; 3) cinética de degradación controlada; 4) resistencia mecánica inicial para una manipulación segura durante la esterilización, almacenamiento, transporte e injerto; 5) bioactividad; 6) biocompatibilidad y 7) no citotoxicidad o inmunogenicidad [14][15]. Por otra parte, la selección de un biomaterial que pueda imitar química y/o físicamente al tejido nativo es uno de los puntos más importantes en la ingeniería de tejidos ósea (BTE, *por sus siglas en inglés*) [16]: por esta razón, el Col-I y la HAp han sido los biomateriales más usados para la elaboración de sustitutos óseos artificiales [16] [17][18][19].

El colágeno se puede aislar de diferentes fuentes animales en grandes cantidades [16] y se puede procesar en una gran variedad de formas como mallas, esponjas, láminas o fibras, entre otros [20]. Por sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas, esta proteína proporciona una topografía basada en nanofibras muy similar a la de la matriz extracelular (MEC) ósea, que favorece la adhesión celular y puede ser degradada por enzimas endógenas facilitando su recambio [10]. A pesar de que ha sido utilizado exitosamente en aplicaciones biomédicas [16], presenta desventajas como la pobre estabilidad mecánica [21]. Debido a esto, el colágeno se combina con otros biomateriales - como la HAp - para mejorar sus propiedades mecánicas. Debido a su biocompatibilidad, bioactividad, alta osteoconducción, comportamiento no citotóxico y no inflamatorio [18] y por ser fuente de iones calcio y fosfato necesarios para la modulación de la respuesta celular [10], la HAp representa una alternativa deseable para la producción de injertos artificiales.

Los soportes desarrollados hasta el momento en la BTE han logrado buenos resultados, regenerando el hueso en defectos de tamaño crítico. Sin embargo, las propiedades estructurales y mecánicas del nuevo hueso formado difieren de las del original,

por lo cual en huesos que normalmente están sometidos a cargas mecánicas, como los hueso largos, las características estructurales y mecánicas del nuevo hueso son de gran importancia [22]. Por esta razón, en este trabajo se desarrollaron prototipos de soportes a base de Col-I o Col-I/HAp bioinspirados en la microestructura del hueso trabecular y del hueso cortical con microestructuras multidireccionales y unidireccionales que *in vivo*, orientaran la formación organizada de hueso; que además, favorecieran la regeneración de tejido estructural y mecánicamente similar al hueso nativo del paciente.

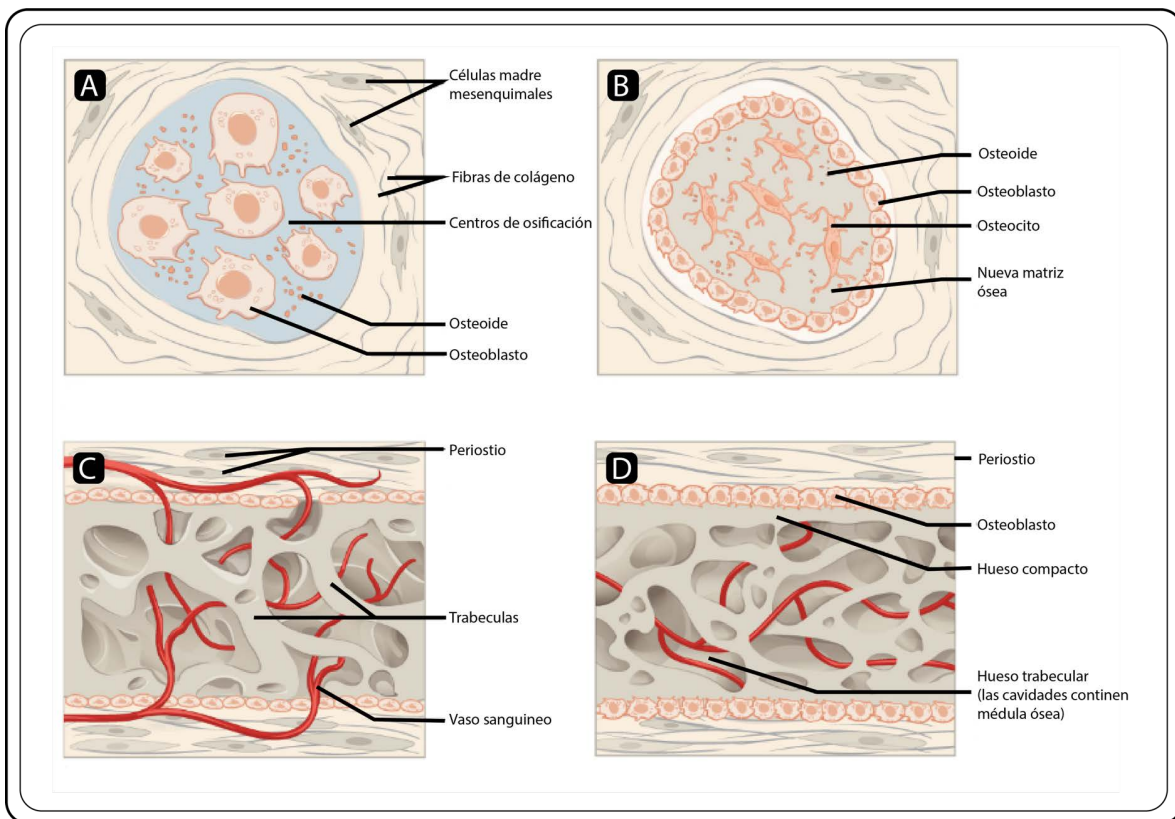
## 2. MARCO TEÓRICO

## 2.1 Hueso

Los huesos son estructuras que, entre otras funciones, brindan soporte estructural al cuerpo, protección para los órganos internos y permiten el movimiento [23]. Están constituidos en un 10% por agua, 60% de una fase mineral formada principalmente por HAp [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] [24] y 30% de una fase orgánica formada por Col-I y, minoritariamente, otros tipos de colágeno, proteínas no colágenas, lípidos y varios tipos de células, incluyendo osteoblastos (OB: productores de matriz extracelular ósea), células de revestimiento óseas, osteocitos (células más abundantes en el hueso) y osteoclastos (OC, reabsorben la matriz extracelular ósea) [23]. El tejido óseo funciona como contenedor de células formadoras de sangre (precursores hematopoyéticos) y como reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  [23]; además, es dinámico debido a que su estructura cambia continuamente en respuesta a señales mecánicas y hormonales [25]. El proceso en el cual el hueso antiguo es remplazado por uno nuevo mediante la acción coordinada de los distintos tipos de células óseas, se conoce como *remodelado óseo* [26][27][28], en un ciclo que comprende tres fases: (1) reabsorción del hueso por los OC, (2) transición desde la reabsorción a la formación de nuevo hueso y (3) formación de nuevo hueso por los OB [29][30]. El remodelado óseo es necesario para la reparación de fracturas, para la adaptación a las cargas mecánicas y para la homeostasis de calcio [31]. Su desbalance resulta en enfermedades como la osteoporosis, pérdida de tejido que se presenta cuando la reabsorción por parte de los OC es mayor que la síntesis de hueso por parte de los OB [32].

Según su forma, los huesos se clasifican en cinco categorías: huesos largos (fémur, tibia, ulna y radio), huesos cortos (hueso carpales de la mano), huesos planos (bóveda craneal, esternón y escapula), huesos irregulares (vertebras) y huesos sesamoideos (desarrollados en el espesor de algunos tendones) [33]. Se pueden formar por osificación intramembranosa, un proceso en el que el hueso compacto y trabecular se desarrolla directamente desde tejido conectivo mesenquimal [34][35]. Al inicio del proceso las células madre mesenquimales (MSC) se condensan y se diferencian a células especializadas, algunas para formar capilares, mientras que otras toman la ruta osteogénica para diferenciarse en OB, formando centros de osificación (Fig. 1A) [34]. Posteriormente, los OB secretan un tipo de matriz sin calcificar llamada *osteoides*, la cual se calcifica endureciéndose con la deposición de sales y atrapando a los OB en ella (Fig. 1B) [34]. A

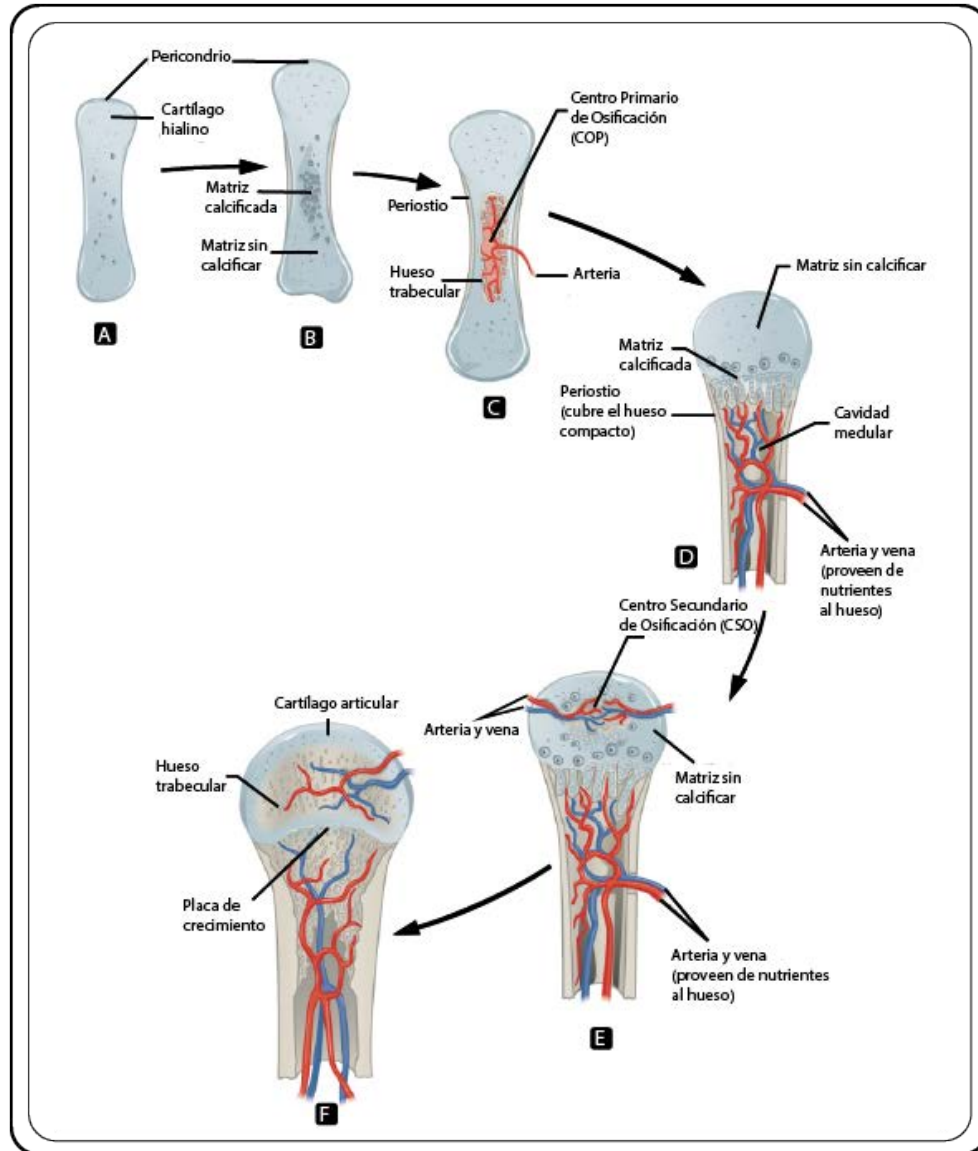
medida que los OB atrapados se transforman en osteocitos, las MSC en el tejido conectivo circundante se diferencian en nuevos OB. El osteoide secretado alrededor de los capilares forma una matriz trabecular en la cual los OB de la superficie forman el *periostio* (Fig. 1C) [34]. El periostio interviene en la formación de una capa densa de hueso compacto que recubre el hueso trabecular formado, el cual aglomera los vasos sanguíneos cercanos formando la *médula ósea roja* (Fig. 1D) [34]. La mayoría de los huesos craneales y las clavículas se forman por esta vía [35].



**Figura 1.** Esquema que ilustra el proceso de osificación intramembranosa. Este proceso sigue cuatro pasos principales: Condensación de MSC y formación de los centros de osificación (A); secreción del osteoide y atrapamiento de los OB que posteriormente se diferencian a osteocitos (B); formación de la matriz trabecular y el periostio (C); formación del hueso compacto superficial y condensación de los vasos sanguíneos (D). *Modificada de* [34].



Los huesos también se pueden formar por osificación endocondral. En este proceso la osificación no obedece a la diferenciación de MSC a un linaje osteogénico, en cambio, el hueso se desarrolla mediante la formación transitoria de un molde de cartílago hialino que luego es reemplazado por tejido óseo. Los huesos de la base del cráneo y los huesos largos se forman por osificación endocondral. Cerca de 6 a 8 semanas después del nacimiento, algunas de las MSC se diferencian a condroblastos, los cuales sintetizan un molde cartilaginoso (Fig. 2A) [33][34][35]. Este molde es una matriz flexible y semisólida constituida por ácido hialurónico, condroitín sulfato, fibras de colágeno y agua [34]. Inicialmente, se forma una membrana delgada que cubre el cartílago, llamada *pericondrio* (Fig. 2B). Estas células depositan una capa de hueso, formando un anillo en la zona central del molde cartilaginoso denominado *anillo de osificación o pericondral*. A medida que se calcifica la matriz y los condrocitos situados en el centro del molde crecen en tamaño (hipertrofia), estos quedan atrapados y mueren debido a que los vasos sanguíneos no los pueden alcanzar. Los espacios dejados por los condrocitos muertos se alargan y unen entre sí para formar la cavidad medular y el cartílago circundante se disgrega permitiendo la entrada de vasos sanguíneos nuevos que traen consigo células osteogénicas, muchas de las cuales se diferenciarán en OB [34]. Cerca del segundo o tercer mes de desarrollo fetal, se forma el *centro primario de osificación* (CPO), una región en el interior del collar perióstico donde se inicia la osificación (Fig. 2C) [34][36]. A medida que el feto se desarrolla el cartílago continúa creciendo hacia los extremos formando las diáfisis (extremos de los huesos largos) donde ocurre la misma secuencia de eventos de mineralización de la matriz, muerte de los condrocitos, invasión de vasos sanguíneos desde el periostio y deposición de células osteogénicas que se diferencian en OB e inician la osificación, formando los *centros secundarios de osificación* (CSO) [34]. A medida que el CPO y los CSO se expanden, entre las epífisis y la diáfisis se forma la *placa de crecimiento*, una estructura cartilaginosa responsable del crecimiento de los huesos [37][38] (Figs. 2D-F).



**Figura 2.** Representación esquemática del proceso de osificación endocondral. Este proceso sigue cinco etapas principales: Las MSC se diferencian en condrocitos (A); se forma el molde cartilaginoso y el pericondrio (B); los capilares penetran en el cartilago y el pericondrio se transforma en periostio, se forman el collar óseo y el centro primario de osificación (CPO) (C); el cartilago continúa creciendo hacia los extremos del molde cartilaginoso para formar las condroepífisis (D); se forman los centros secundarios de osificación (CSO), lo cuales junto con el CPO se expanden osificando el molde cartilaginoso y formando la placa de crecimiento (E-F). *Modificada de [34].*

## 2.2 Células Óseas

### 2.2.1 Osteoblastos

Los OB son células cuboides que se localizan a lo largo de la superficie del hueso y comprenden alrededor del 4-6% del total de células de este tejido; se encargan de la producción de la matriz extracelular ósea (Fig. 3B) [39]. Como es usual en células especializadas en sintetizar proteínas, los OB presentan un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso prominentes, así como abundantes vesículas [39][40][41]. Estas células derivan de las MSC, cuya capacidad de diferenciarse a un linaje osteogénico requiere la expresión de genes específicos como *Runx2* y de factores de transcripción como RUNX-2, Dlx5 y Osterix (Osx) [39][42]. Cuando inician su proliferación expresan fosfatasa alcalina (ALP) [39] y durante su maduración incrementan la expresión de Osx y la secreción de proteínas de matriz ósea como osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP) I/II y Col-I. También, sufren cambios morfológicos volviéndose cuboides [42][41].

### 2.2.2 Osteocitos

Constituyen cerca del 95% de la población total del tejido óseo, siendo las células más abundantes [43]. Aunque no son células secretoras de matriz ósea expresan OCN, osteonectina y osteopontina (OPN), proteínas involucradas en la osificación de la matriz ósea [44]. Aunque están inmersas en una matriz ósea endurecida, su morfología estrellada, con prolongaciones citoplasmáticas albergadas en pequeños canales (canalículos) en la matriz (Fig. 3A) les permite comunicarse con células de la superficie ósea, OB, células de revestimiento y otros osteocitos [45][43]. Una de las principales funciones atribuidas al osteocito es la de captar y traducir los estímulos mecánicos que actúan sobre el hueso, capacidad indispensable para regular la remodelación ósea durante la adaptación funcional a las cargas mecánicas y a la reparación de microfracturas [46][47].

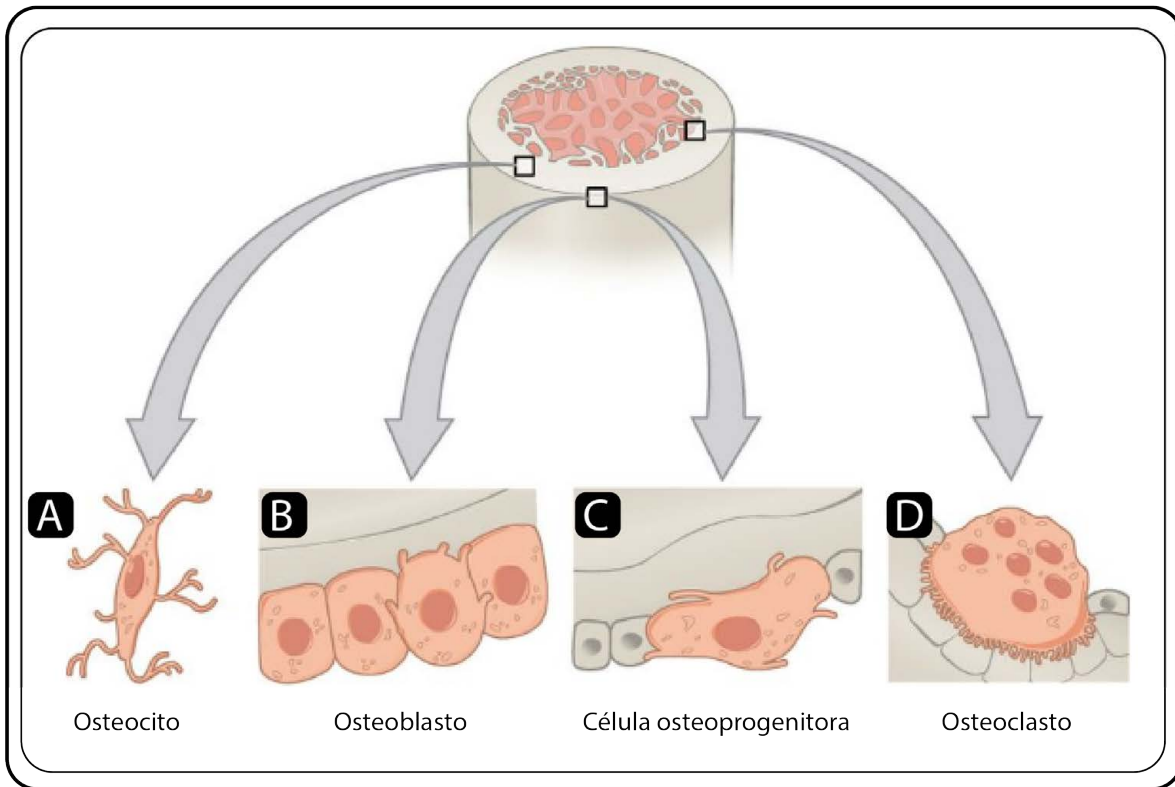
### 2.2.3 Osteoclastos

Los OC comprenden solo el 1-2% de las células óseas [48]. Son células gigantes multinucleadas encargadas de la reabsorción del hueso [49][50]. Estas células se localizan en la superficie interna de los *túneles de Havers* del hueso cortical, en las trabéculas del

hueso esponjoso con un diámetro mayor a 200  $\mu\text{m}$  y bajo el periostio [48]. Su morfología se caracteriza por ser una estructura polarizada con una región de intercambio de señales externas y una zona unida a la matriz calcificada a través de una estructura denominada *ribete en cepillo* (Fig. 3D). Se originan de células madre y comparten precursores con los macrófagos [30]. Estas células se desplazan sobre la superficie calcificada del hueso mediante podosomas que, gracias a la presencia de integrinas  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , interaccionan con proteínas de la matriz como osteopontina y vitronectina. Erosionan al hueso formando cavidades denominadas *lagunas de Howship*; al activarse se polarizan y la zona basolateral de la membrana participa en la comunicación celular y en el transporte de iones. Exhiben alta actividad de anhidrasa carbónica II, la cual disocia al ácido carbónico citosólico en protones ( $\text{H}^+$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), el cual se intercambia con cloro ( $\text{Cl}^-$ ) mediante un canal específico. El protón se dirige al ribete en cepillo, donde una bomba  $\text{H}^+$ -ATPasa lo transporta a la laguna. En la vecindad de esta bomba se sitúa el canal iónico de cloro 7 (ClC7) que intercambia dos iones  $\text{Cl}^-$  por un  $\text{H}^+$ , contribuyendo a la acidificación durante la resorción ósea [48].

#### 2.2.4 Células de Revestimiento Óseo

Son células con morfología alargada y aplanada que se encuentran recubriendo la superficie del hueso (Fig. 3C) [51]. Juegan un papel importante en el remodelado óseo ya que se comunican con los osteocitos mediante uniones comunicantes (GAP), promoviendo la diferenciación de células madre hematopoyéticas (HSCs) a OC [30]. Además, durante este proceso secretan metaloproteinasas que remueven las fibrillas de colágeno no mineralizadas de la superficie del hueso. También juegan un papel importante después de la remodelación ósea, ya que son las células encargadas de sintetizar y depositar las capas de colágeno sobre la superficie del hueso [30].

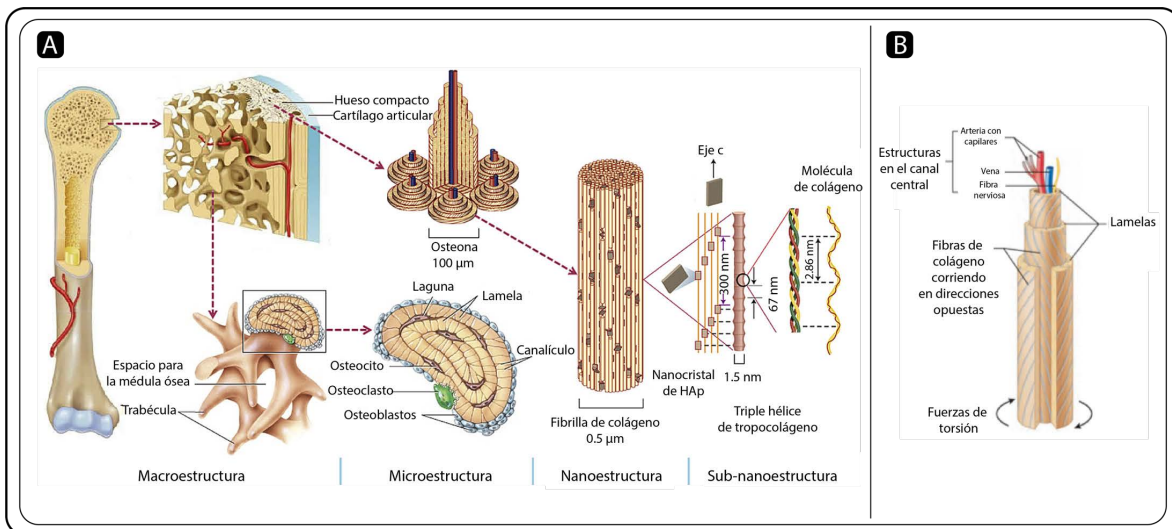


**Figura 3.** Ilustración de los diferentes tipos de células óseas. El hueso está formado por diferentes tipos de células. Los osteocitos, las principales células del hueso maduro, poseen una morfología estrellada y cumplen funciones sensoriales en respuesta a estímulos mecánicos (A); las células productoras de matriz extracelular ósea llamadas OB, presentan una morfología redondeada (B); las células osteoprogenitoras o MSC, con potencial para diferenciarse a un linaje osteogénico se encuentran en los conductos de Havers, en el endostio y en el periostio del hueso, y presentan una morfología fusiforme (C). Finalmente los OC son células multinucleadas gigantes polarizadas involucradas en la reabsorción del hueso (D). Tomada de [52].

### 2.3 Estructura del Tejido Óseo

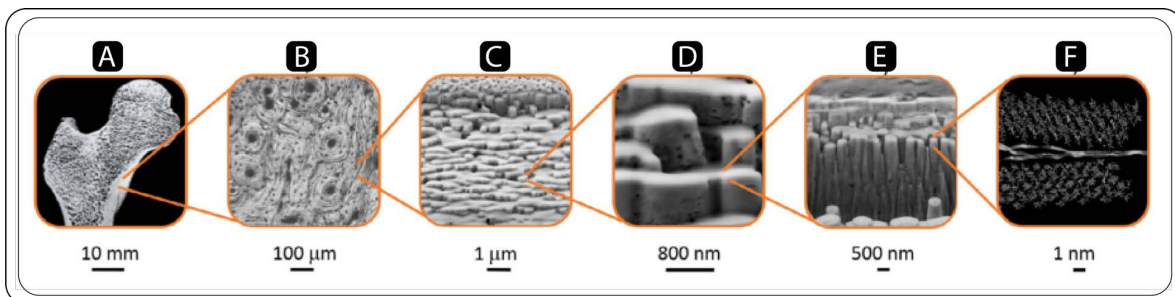
Las fibras de Col-I y los cristales de HAp que componen la matriz ósea hacen en el hueso una función similar a la que hacen las varillas de acero y el cemento en el concreto, una parte provee flexibilidad y la otra provee rigidez [53]. Esta característica convierte al hueso en un tejido multifuncional que sirve como soporte mecánico y de protección, gracias a que puede soportar la deformación causada por cargas o impactos y al mismo tiempo es capaz de absorber o disipar la energía cambiando de forma sin agrietarse (deformación elástica) [53][54]. Existen dos tipos de hueso según su densidad: el hueso cortical o compacto y el hueso trabecular o esponjoso [55][56][57]. El hueso cortical está formado

por un tejido laminar que rodea la cavidad medular; además, posee una estructura densa calcificada casi sólida con pequeños espacios (entre 10-30% ) entre los osteocitos, canalículos, vasos sanguíneos y cavidades de erosión [33]. Su unidad estructural es la *osteona*, formación concéntrica columnar cuyo tamaño varía entre 10-500  $\mu\text{m}$  dispuesta lo largo del eje longitudinal del hueso (Fig. 4A). Las osteonas están formadas por paredes concéntricas llamadas lamelas, en las cuales las fibras de Col-I y los cristales de HAP transcurren en forma paralela unidireccional oblicua como se observa en la Figura 4B. La orientación unidireccional de las fibras de colágeno en las lamelas es antiparalela, característica que le permite al hueso cortical soportar fuerzas de torsión y le confiere su capacidad de resistir esfuerzos mecánicos de magnitudes altas [58]. El hueso trabecular es altamente poroso (70-90%), característica que le permite albergar a la médula ósea [53]. Cada trabécula está compuesta de varias lamelas, que en este caso no forman osteonas, y permiten la difusión de nutrientes [33].



**Figura 4.** Esquema de la organización estructural jerárquica del hueso, desde la escala macro a la escala sub-nanométrica (A). *Modificada de* [59]. Estructura lamelar de del hueso cortical. Disposición unidireccional oblicua que alterna el direccionamiento de una lamela a la siguiente (B). *Modificada de* [58].

El tejido óseo se organiza jerárquicamente y cada nivel de organización cumple un papel mecánico, biológico o químico [60]. De este modo, el tejido óseo se organiza a nivel de macroescala, microescala, sub-microescala, nanoescala y sub-nanoescala (ver Figs. 4 y 5) [60][61]. En el nivel de macroescala se encuentran el hueso cortical, incluyendo el sistema de Havers, y el hueso trabecular. A nivel de micro- y nanoescala se encuentran los agregados de fibras de Col-I y los cristales de HAp [60]. Los diferentes niveles de organización del hueso son mostrados en la Figura 5.



**Figura 5.** Fotografías de la estructura ósea jerárquica en diferentes escalas. Macroescala -es posible distinguir el hueso cortical del trabecular- (A); microestructura del hueso cortical, también conocida como sistema de Havers -estructuras cilíndricas llamadas osteonas- (B); paredes concéntricas que forman las osteonas -lamelas- (C); haces de fibras de Col-I (D); fibrillas mineralizadas de Col-I (E); molécula de tropocolágeno simple rodeada de nanocristales de HAp (F). *Modificada de [61].*

## 2.4 Regeneración Ósea

Como se ha mencionado antes, las propiedades mecánicas del hueso le permiten soportar la deformación; sin embargo, cuando las cargas exceden un umbral, se da la deformación plástica, en la cual el tejido no puede recuperar su forma inicial; lo cual, conduce a la acumulación de microfracturas que actúan como un mecanismo de defensa contra daños mayores, como fracturas completas, en las que el tejido no es capaz de sanar por si solo [53]. El mecanismo de detección de los esfuerzos mecánicos y la respuesta mediante la formación de nuevo hueso que las contrarresta, involucra la acción de los osteocitos mediante un proceso llamado mecanotransducción y un proceso de reparación llamado remodelado, en el cual intervienen los OB y los OC [62].

## 2.5 Reparación de Fracturas

El hueso es un tejido capaz de sanar sin cicatriz fibrosa, porque puede formar nuevo hueso por vía directa o indirecta. Esta última es la más común y se da cuando se presentan condiciones de estabilidad mecánica. En este caso, el sistema de Havers y el hueso lamelar se restauran sin que sea necesario un proceso de remodelación. Por el contrario, en condiciones mecánicamente no estables, la reparación de la fractura sigue una ruta que involucra una respuesta inflamatoria que desencadena la liberación de mediadores de la inflamación y el reclutamiento de MSC con el fin de generar un callo cartilaginoso; el cual, se vasculariza y calcifica para finalmente ser remodelado, restaurando la estructura del hueso [63]. A continuación, se describen en más detalle las vías directa e indirecta de reparación de fracturas.

### 2.5.1 Reparación Directa

Es un proceso más rápido que la reparación indirecta. El mecanismo involucra la formación de hueso por vía intramembranosa [64]; ocurre cuando los extremos de la fractura están en contacto, cuando existe un espacio (gap) menor a 1mm entre ellos y cuando la tensión interfragmentaria es menor al 2%. Los OB presentes en los extremos cruzan la línea de la fractura generando cavidades longitudinales que llenan con nueva matriz. Esto resulta en la generación simultánea de una unión ósea y la posterior restauración del sistema de Havers en dirección axial. Con el restablecimiento del sistema de Havers, se estimula la penetración de los vasos sanguíneos que traen consigo precursores osteoblásticos que remplazan gradualmente el hueso primario [63].

### 2.5.2 Reparación Indirecta de Fracturas

Este tipo de reparación es la más común e involucra osificación endocondral e intramembranosa (Fig. 6). No requiere condiciones de estabilidad: por el contrario, se ve influenciada por micromovimientos. Sin embargo, condiciones de carga y movimiento excesivos puede resultar en un retraso de la reparación de la fractura o incluso en no unión de los fragmentos [63]. Este proceso involucra varias etapas, las cuales se describen a continuación:



### **2.5.2.1 Respuesta Inflamatoria Aguda**

La respuesta inflamatoria aguda limpia el foco de la fractura para facilitar su consolidación [65]. Inmediatamente después del trauma, se forma un hematoma compuesto de células de la sangre periférica y de la sangre intramedular que al coagular entre y alrededor de los extremos de la fractura, forma el molde que guiará la formación del callo cartilaginoso [63]. La respuesta inflamatoria alcanza su pico 48 horas después de la lesión y desaparece completamente una semana después. Este proceso es de suma importancia en esta vía de reparación debido a que ayuda a inmovilizar la fractura [66]. Después de la primera semana el coágulo es invadido por capilares y fibroblastos que lo transforman en tejido conjuntivo de granulación y posteriormente es invadido por vasos provenientes del periostio, del endostio y del sistema de Havers [65]. El reclutamiento de las células inflamatorias y de la promoción de la vasculogénesis se da por la secreción de factores como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), VEGF, interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-11 e IL-18 [63].

### **2.5.2.2 Reclutamiento de Células Madre Mesenquimales**

Para que se pueda dar el proceso de regeneración, las MSC provenientes de tejidos blandos circundantes y de la medula ósea deben migrar al sitio de la lesión, proliferar y diferenciarse en células osteogénicas. Su migración es estimulada por factores quimioatrayentes entre los que se encuentran las proteínas morfogénicas óseas-2 y -7 (BMP-2, BMP-7), el factor derivado de células estromales (SDF-1) y su receptor acoplado a proteína G, CXCR-4; los cuales, incrementan su expresión en el periostio y en los bordes de la fractura. Recientemente se ha demostrado la importancia del factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), ya que la ruptura de los vasos sanguíneos en el sitio de la lesión provoca una interrupción en el suministro de oxígeno, el cual inhibe la formación normal de hueso. HIF-1 $\alpha$  induce la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), conocido por su importante papel en el proceso de vascularización [63].

### 2.5.2.3 Formación de Callo Cartilaginoso

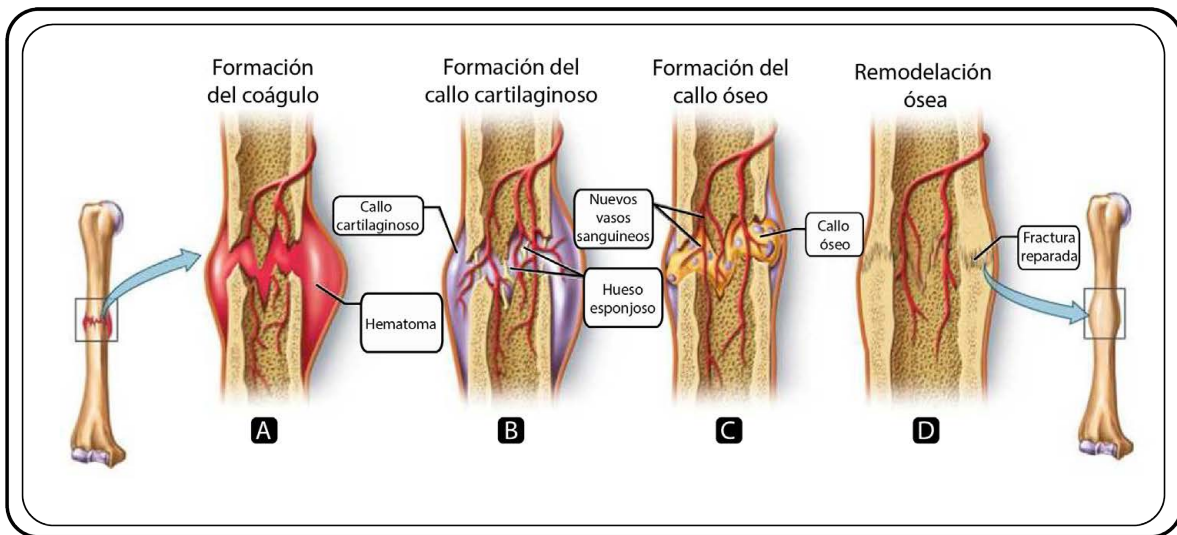
Después de la formación del hematoma, el cual estabiliza inicialmente la fractura, se forma un tejido rico en fibrina conocido como tejido de granulación. En este, se da el proceso de osificación endocondral que da origen a un callo suave que estabiliza mecánicamente la fractura. Este proceso se ha seguido en modelos animales, identificando marcadores extracelulares para procolágeno II y proteoglicanos después de 7-9 días del trauma. Simultáneamente, en la zona subperióstica adyacente a los extremos distal y proximal de la fractura se da un proceso de osificación intramembranosa que forma un callo duro. El callo cartilaginoso es lo que finalmente permite la estabilización de la zona de fractura y la capacidad de soportar peso [63]. La formación de este depende del reclutamiento de las MSC y de una cascada molecular que involucra la producción de proteínas de matriz extracelular como Col-I y -II y la expresión de proteínas de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), entre ellas las involucradas en condrogénesis y osificación endocondral (TGF-  $\beta$ 2, - $\beta$ 3 y GDF-5;). Por otra parte, las proteínas BMP-5 y -6 inducen la proliferación celular en los sitios periósticos donde ocurre la osificación intramembranosa. A su vez, la BMP-2 juega un papel importante en la iniciación de la cascada de reparación ósea, hecho demostrado en ratones mutantes para esta proteína en los cuales el callo cartilaginoso no se forma [67] [63].

### 2.5.2.4 Mineralización y Reabsorción del Callo Cartilaginoso

El callo cartilaginoso debe ser reabsorbido y remplazado por un callo óseo. Durante este proceso los condrocitos proliferan y se hipertrofian, mientras que la MEC se calcifica. La reabsorción del cartílago mineralizado y el reclutamiento de células óseas es dirigida principalmente por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el ligando de receptor activador para el factor nuclear Kappa B (RANKL), la osteoprotegerina (OPG) y el TNF- $\alpha$ . A medida que progresa la formación del callo y el cartílago calcificado es remplazado por hueso lamelar, aumenta la rigidez y por ende la estabilidad mecánica [63].

### 2.5.2.5 Remodelado Óseo

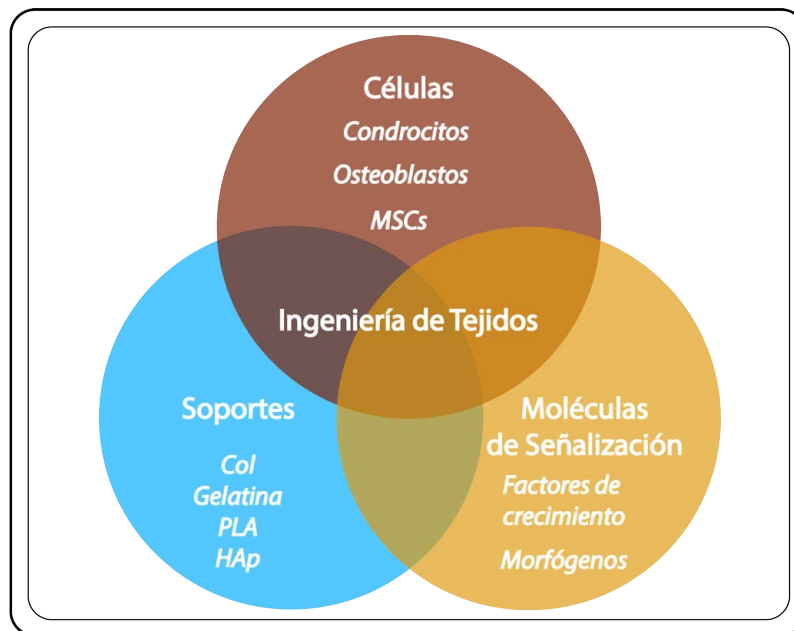
A pesar de que el callo óseo es una estructura mecánicamente estable, este no restablece completamente la estabilidad estructural del hueso. Por esta razón, se desencadena una segunda fase de reabsorción para remodelar el callo óseo y formar una estructura lamelar con cavidad medular. En este proceso debe haber un balance de reabsorción ósea por parte de los OC y la deposición de hueso lamelar por parte de los OB [63]. El remodelado puede durar varios meses o incluso años en completarse; sin embargo, después de que el proceso ha finalizado el tejido puede recuperar su integridad estructural [68] y la resistencia mecánica, en un proceso adaptativo que involucra el refuerzo de algunas zonas mediante la deposición de hueso, y la reabsorción de otras en función de las cargas mecánicas. Esta fase es orquestada por la IL-1 y TNF- $\alpha$  y BMP-2 [65].



**Figura 6.** Ilustración del proceso de reparación de fracturas indirecto. Respuesta inflamatoria aguda – formación del coágulo (A); formación del callo cartilaginoso (B); mineralización y reabsorción del callo cartilaginoso (C); remodelado óseo (D). *Modificada de [69].*

## 2.6 Ingeniería de Tejidos: Aspectos Generales

La ingeniería de tejidos (TE) es un campo de investigación multidisciplinar que busca mitigar la escasez de tejidos y órganos para donación, mediante la síntesis de estructuras biológicas que reemplacen los injertos o trasplantes naturales [70]. Utiliza células, matrices o soportes tridimensionales (*scaffolds*) y el entorno extracelular para crear sustitutos biológicos que sustituyan un tejido o parte de él (Fig. 7). El éxito de los productos obtenidos por TE depende en gran parte de su composición química, propiedades mecánicas, microestructura (porosidad, tamaño de poro, interconectividad), biodegradabilidad y microtopografía [71]. En los últimos años la TE ha desarrollado estrategias terapéuticas sofisticadas como el desarrollo modelos de enfermedades humanas bioinspirados, herramientas de rastreo de medicamentos, micro-tejidos y biomarcadores útiles en el diagnóstico y en terapéutica. La tendencia actual es producir microestructuras que imiten las interacciones tridimensionales de los componentes de los tejidos *in vivo*, permitiendo un acercamiento más íntimo a la compleja dinámica física, biológica y bioquímica de estos [72].



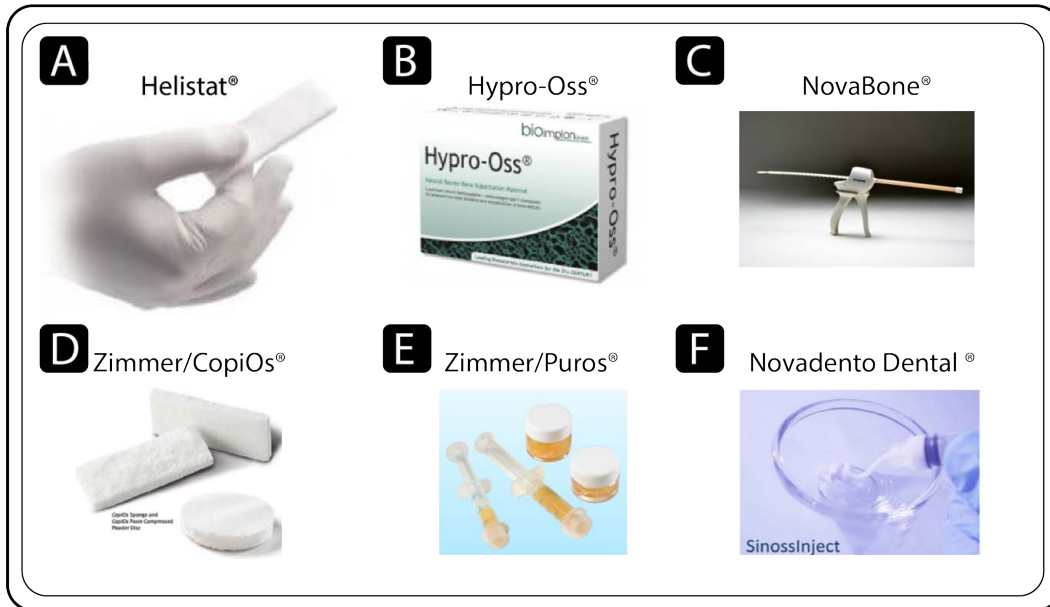
**Figura 7.** Esquema del principio fundamental de la TE. Se basa en la triada constituida por: células con capacidad de producir MEC, soportes elaborados con biomateriales que promuevan la migración, adhesión y proliferación celular, y moléculas de señalización que promuevan la diferenciación celular.

## 2.7 Ingeniería de Tejidos Ósea

Desde su inicio hace más de 3 décadas, la ingeniería de tejidos ósea (BTE) ha experimentando un crecimiento exponencial debido a la demanda de sustitutos óseos. Se enfoca en el desarrollo de alternativas terapéuticas que puedan eliminar los problemas experimentados por las técnicas convencionales como morbilidad en los pacientes, la disponibilidad limitada de injertos óseos, el rechazo inmune y la transferencia de patógenos, entre otros. Existen cuatro componentes principales en la BTE: (1) elaboración de soportes (scaffolds) con microestructuras que se asemejen lo más posible a la MEC nativa; (2) células osteogénicas con capacidad de producir nueva MEC; (3) señales morfogénicas que ayudan a diferenciar las células a un fenotipo osteoblástico y (4) vascularización suficiente para suplir las necesidades de nutrientes y oxígeno del nuevo tejido formado. A pesar del éxito de los desarrollos en este campo, algunos de los cuales ya han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos Estadounidense (FDA) y se encuentran disponibles para su uso en pacientes, aun se están haciendo esfuerzos enfocados en el desarrollo de tecnologías con la mejor relación costo-efectiva [7].

## 2.8 Productos Comerciales para Regeneración de Tejido Óseo

La mayoría de los productos disponibles en el mercado son substratos tridimensionales biodegradables que permiten la proliferación, adhesión y diferenciación celular; que interactúan con el sitio y las células presentes en la lesión para promover la formación de tejido nuevo con características mecánicas y físicas similares a las del hueso nativo [73]. Para la elaboración de estos substratos, se usan una gran variedad de biomateriales, incluyendo cerámicas, metales, polímeros (naturales y sintéticos) y sus combinaciones [74]. La Figura 8 muestra algunos productos comerciales con sus principales características.



**Figura 8.** Imágenes de los productos comerciales para regeneración ósea. Esponja hemostática sintetizada partir de tendón de Aquiles bovino (A); material de sustitución óseo bovino con incorporación de atelocolágeno granular conteniendo aproximadamente 30% de atelocolágeno y 70% de hidroxiapatita. Se usa como material de llenado en defectos óseos en cirugía ortopédica y traumatología (B); dispositivo bioactivo osteoconductor usado para implantes de tejido óseo. Es una mezcla de fosfosilicato de calcio y un pegante sintético absorbible compuesto de polietilenglicol y glicerina (C); esponjas liofilizadas osteoconductoras de Col-I bovino altamente purificado y fosfato de calcio dibásico (D); matriz ósea 100% hueso humano desmineralizado maleable que permite su empaque en diferentes dispositivos (E); pasta dental inyectable con alta bioactividad, constituido en gran parte por HAp (F).

## 2.9 Biomateriales para Ingeniería de Tejidos Ósea

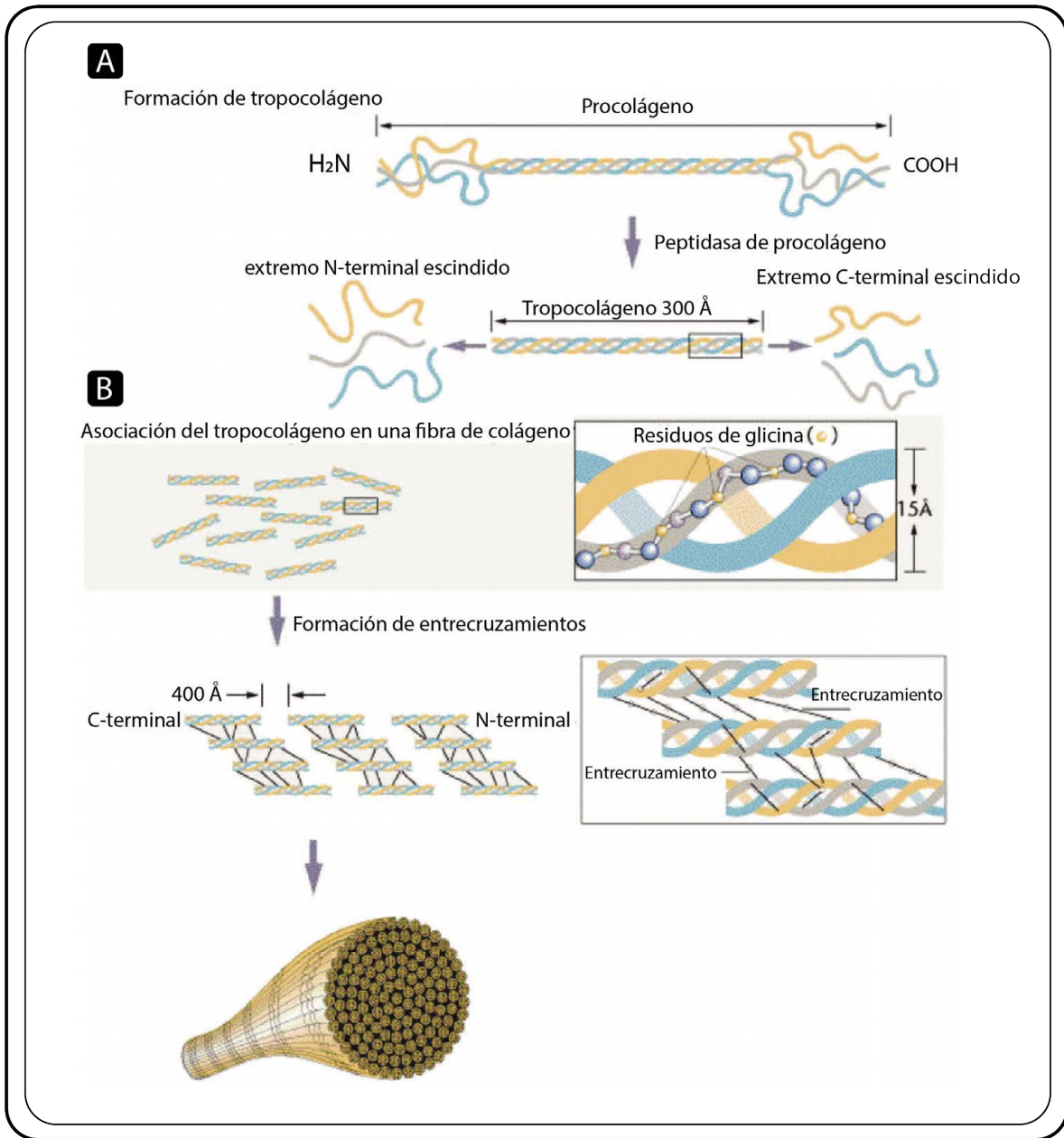
En un principio, los biomateriales usados por la BTE eran bioinertes; posteriormente, se usaron materiales bioactivos con capacidad interactuar con moléculas biológicas y células del ambiente óseo. Hoy se sabe que los biomateriales y soportes elaborados con ellos, deben reabsorberse en sincronía temporal con la formación del nuevo tejido. Además, deben tener una o varias de las siguientes características:

- **Osteoconductividad:** Es la capacidad de permitir que las células se adhieran, proliferen y formen MEC en su superficie y en los poros. Esta característica está estrechamente relacionada con la biodegradabilidad del material ya que este debe reabsorberse a una tasa suficientemente lenta y controlada para permitir que las células lo usen como molde para producir nuevo tejido.

- Osteoinductividad: Es la capacidad de inducir la formación de nuevo hueso a través de estímulos bioquímicos o mecánicos, reclutando células osteoprogenitoras e induciendo su diferenciación hacia un fenotipo osteogénico.
- Osteogénesis: Es la capacidad de actuar como reservorio de osteoblastos o MSC (con potencial osteogénico) ya que estas células tienen la capacidad de formar y mineralizar la matriz extracelular del nuevo tejido.
- Osteointegridad: Es la capacidad de formar uniones fuertes con el hueso circundante, permitiendo la continuidad del material y la transferencia adecuada de cargas mecánicas [75].

### 2.9.1 Colágeno e Hidroxiapatita como Biomateriales para la Ingeniería de Tejidos Ósea

El colágeno es una familia constituida por 28 moléculas que se agrupan en dos grandes subfamilias: (1) colágenos fibrilares y (2) colágenos no fibrilares. El colágeno tipo I (Col-I) es un colágeno fibrilar secretado por las células que hacen parte de los tejidos conectivos, responsable de la resistencia a la tensión. Es la proteína más abundante de la matriz extracelular de los tejidos, por ser altamente conservada en mamíferos tiene baja antigenicidad, es biodegradable y se puede combinar con otros materiales [76]. Estructuralmente es un heterotrímero compuesto por dos cadenas alfa 1 ( $\alpha 1$ ) y una cadena alfa 2 ( $\alpha 2$ ); después de ser traducidas en el retículo endoplásmico rugoso, estas cadenas se pliegan entre sí para formar la triple hélice característica de esta proteína. La estructura primaria de cada péptido se caracteriza por tener una tripleta de amino ácidos (glicina-X-Y) repetida, donde la mayoría de las veces X y Y son prolina e hidroxiprolina. Después de ser secretada al espacio extracelular, los extremos amino y carboxil terminal de la triple hélice son escindidos; la molécula resultante (tropocolágeno), es entrecruzada con más tropocolágeno por la enzima lisiloxidasas para formar la fibra de colágeno (Fig. 9) [77].



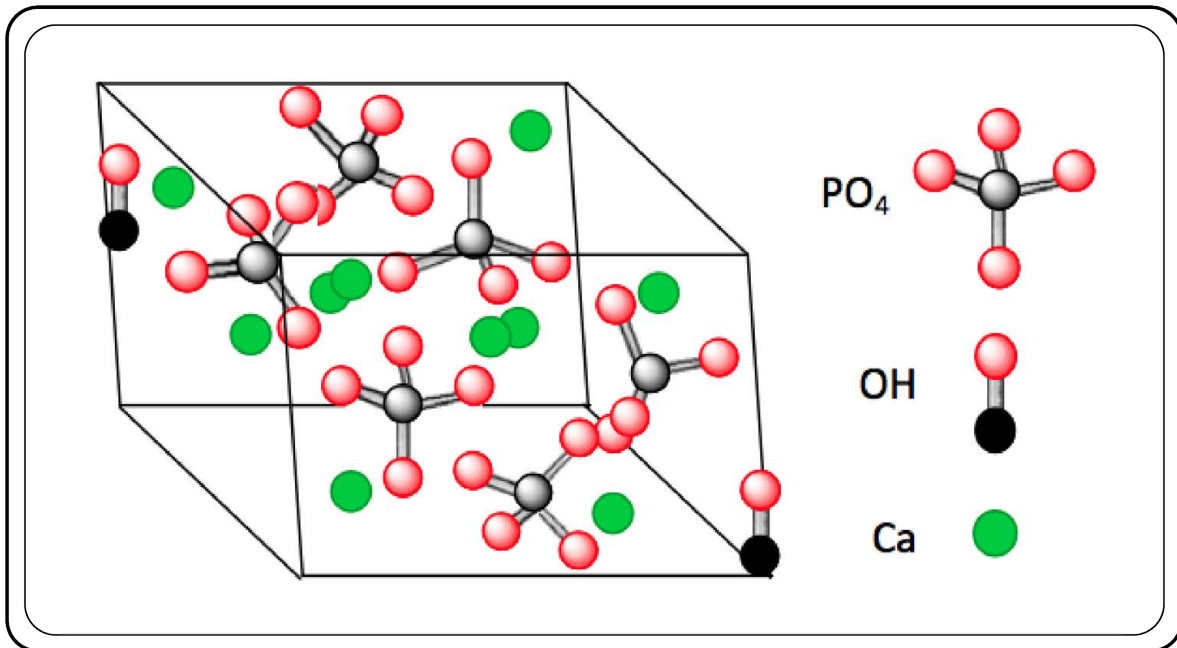
**Figura 9.** Esquema de la estructura fibrilar del colágeno. Formación de tropocolágeno a partir de procolágeno (A); formación de fibras de colágeno a partir de la asociación de tropocolágeno y la formación de entrecruzamientos. *Tomada de [78].*

La HAp  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  es el material mineral que confiere la dureza característica a los dientes y huesos. Pertenece a la familia de las apatitas y presenta una estructura hexagonal (Fig. 10); en la naturaleza, se pueden encontrar formando parte de las



rocas sedimentarias y metamórficas. En los huesos, está siempre acompañada de compuestos orgánicos como el colágeno [79].

Los principales componentes químicos de la hidroxiapatita son el calcio y el fosfato. Sin embargo, la HAp natural contiene también porcentajes mínimos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso. Dependiendo de su origen, la HAp puede ser natural o sintética; ambas, son osteoconductoras y permiten iniciar el proceso de regeneración ósea. La HAp promueve la proliferación, migración y adhesión de las células; gracias a que forma uniones fuertes entre el hueso y su superficie [80], se ha usado ampliamente en implantes metálicos revestidos para mejorar su bioactividad [81].



**Figura 10.** Esquema del arreglo atómico en la celda unitaria hexagonal de la HAp. Se muestran las posiciones atómicas del Ca, OH y  $\text{PO}_4$ . Tomada de [82].

### 2.9.2 Biomateriales Compuestos Colágeno tipo I/Hidroxiapatita

Por sus propiedades y debido a que son los componentes principales de la matriz extracelular ósea, el Col-I y la HAp se han utilizado para desarrollar productos para BTE. El Col-I se ha empleado en el tratamiento de defectos localizados en sitios anatómicos que no están sometidos a cargas, debido a que carece de rigidez mecánica. De ahí, que se haya recurrido a mezclarlo con otros biomateriales, entre ellos la HAp, para mejorar sus propiedades mecánicas. Por ejemplo, soportes de Col-I e HAp presentan un módulo de

compresión un orden de magnitud mayor que los soportes de Col-I solo [83]. Los soportes de Col-I-HAp son más rígidos, lo cual facilita el manejo quirúrgico y la fijación post-implantación. Adicionalmente, *in vitro* los soportes de Col I-HAp han demostrado ser conductivos, favoreciendo la infiltración y diferenciación de MSC, aumentando la osteogénesis [83] [84].

## 2.10 Consideraciones para el Diseño de Soportes para la Ingeniería de Tejidos Ósea

Los soportes (*scaffolds*) son esenciales para el éxito de las terapias de regeneración ósea. Estos deben proveer un ambiente tridimensional que promueva la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular para lograr la formación de nuevo hueso. Con ese propósito, deben cumplir con los siguientes requerimientos:

### 2.10.1 Biocompatibilidad

En 1985 en Chester, (Reino Unido) se celebró la conferencia consenso a partir de la cual publicó un libro para ofrecer una definición unificada de la biocompatibilidad de un material para uso biomédico. Esta definición presenta a la biocompatibilidad de un material como

*“la capacidad de un material de provocar una respuesta adecuada en el huésped en una aplicación específica”* [85].

En otras palabras, para que un material se considere biocompatible, este o sus productos de degradación no deben generar una respuesta inmune indeseable o ser citotóxicos cuando se implantan *in vivo* y, además, debe generar efectos positivos, como inducir la formación de nuevo tejido mediante la diferenciación de células con potencial osteogénico [86].

## 2.10.2 Propiedades Mecánicas

Cuando se implantan *in vivo* los soportes están sometidos a esfuerzos mecánicos (e.g: compresión, tensión, torsión y esfuerzos cortantes), por lo que deben tener la estabilidad mecánica requerida para permitir la migración, adhesión y proliferación celular; la deposición de nuevo tejido y la regeneración del defecto óseo [87]. Por eso, deben ser compatibles mecánicamente; es decir, deben semejar las propiedades mecánicas del tejido [75]. Por ejemplo, los soportes desarrollados a partir de Col-I/HAp pueden tener módulos de compresión cercanos a 0,5-2,0 MPa [83], sin embargo, comparado con el módulo de compresión del hueso nativo (130-230 MPa) (Tabla 1), siguen estando alejados [75]. Por eso, se busca un sistema que al ser implantado *in vivo* permita la formación de tejido con módulo de elasticidad, resistencia a la tracción, tenacidad a la fractura, fatiga y el porcentaje de elongación máxima tan cercanas como sea posible a las del tejido. Debido a las propiedades mecánicas únicas del hueso el desarrollo de soportes para BTE sigue siendo un desafío en este campo de investigación [75].

**Tabla 1.** Propiedades mecánicas del hueso.

<b>Propiedad mecánica</b>	<b>Hueso cortical</b>	<b>Hueso trabecular</b>
Resistencia a la tracción (MPa)	50-150	10-100
Módulo de compresión (MPa)	130-230	2-12
Módulo de Young (GPa)	7-30	0.02 – 0.5
Tensión de rotura (%)	1-3	5-7
Esfuerzo cortante (MPa)	53-70	

## 2.10.3 Biodegradabilidad

Se refiere a la capacidad de un biomaterial de degradarse durante el tiempo, preferiblemente de forma controlada y con una tasa de reabsorción similar a la de la formación de nuevo tejido. El soporte debe mantener la integridad estructural y mecánica mientras las células migran, proliferan, se diferencian y producen nueva MEC. Para el uso en BTE los soportes deben tener una tasa de degradación que encaje con la formación de nuevo hueso, proceso que puede tardar entre 8-9 meses para fusiones espinales y entre 3-6 meses en lesiones craneofaciales y en huesos largos [75].

#### 2.10.4 Microestructura

La microestructura contempla principalmente la porosidad, el tamaño de poro y la interconectividad de estos. Estas características afectan la distribución espacial y la localización de las células, la difusión de nutrientes y de oxígeno, afectando directamente la viabilidad del tejido nuevo formado. Los soportes porosos facilitan la migración y proliferación de las células, así como, la difusión de nutrientes y oxígeno. Las porosidades altas (>90%) [88] también proveen una alta área superficial interna que facilita la adhesión celular. Además, los poros deben estar interconectados permitiendo la comunicación intercelular y la transferencia de masa. Desafortunadamente las estructuras altamente porosas tienen una relación inversamente proporcional con la resistencia mecánica, a mayor porosidad menor resistencia, por lo que se debe alcanzar un balance entre la porosidad y las propiedades mecánicas [75]. Por otra parte, el tamaño de poro debe estar en un rango crítico que dependerá del tipo celular, debido a que el tamaño de poro debe ser lo suficientemente grande para que las células puedan ingresar en la microestructura pero sin superar un tamaño en el que las células no puedan adherirse a las paredes de cada poro [88]. En el caso de los soportes para BTE el rango debe estar comprendido entre 100-300 $\mu\text{m}$ . Los poros pequeños (50-100 $\mu\text{m}$ ) favorecen condiciones hipóxicas e inducen la formación endocondral de hueso, mientras que poros grandes (300-400 $\mu\text{m}$ ) favorecen la formación de hueso por vía intramembranosa. Por su parte, en BTE es de importancia el desarrollo de soportes que induzcan la formación de hueso con características microestructurales similares a las del hueso cortical y a las del hueso trabecular, esto con el fin de garantizar que el nuevo hueso formado sea estructural y funcionalmente similar al hueso nativo [89].

#### 2.11 Células Madre Mesenquimales para Ingeniería de Tejidos Ósea

Las células que más se estudian en BTE son las MSC [90], células indiferenciadas capaces de autorenovarse y proliferar [91]. Tienen la capacidad de diferenciarse a líneas celulares como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales, células nerviosas, cardiomiocitos, hepatocitos y células pancreáticas [92]. En BTE se han empleado MSC derivadas de médula ósea (BM-MS), de cordón umbilical (UBC-MS), de tejido adiposo (ADSC), de músculo (MDSC) y de pulpa dental (DPSC) [93]. Las MSC son

inmunomoduladoras a través de la activación de linfocitos T supresores, por eso, son una herramienta en aplicaciones de terapia celular y génica. Por ejemplo, mejoran el trasplante de células madre alogénicas reduciendo la incidencia de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Las MSC identifican el área dañada gracias a un efecto paracrino y se implantan para acelerar el proceso de reparación de la lesión secretando factores [92].

## 2.12 Factores de Crecimiento Relevantes en la Ingeniería de Tejidos Ósea

Los factores de crecimiento son moléculas tales como citoquinas u hormonas, las cuales actúan como señales bioquímicas capaces de desencadenar procesos celulares como proliferación, migración o diferenciación. A continuación se describen brevemente algunos de los factores más importantes en la BTE:

- Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs): Hacen parte de la superfamilia de proteínas del TGF- $\beta$ . Estimulan la proliferación de condrocitos y osteoblastos y la diferenciación de las MSC a estos linajes, incrementando la producción de MEC. Después de ser sintetizadas son secuestradas por las fibras de colágeno de la MEC, que se convierten en un reservorio importante de ellas; también, se encuentran en las células del periostio y en la médula ósea del hueso. Intervienen en la formación del tejido esquelético durante la embriogénesis y el crecimiento, y actúan durante la reparación de las lesiones óseas, en donde se difunden desde la matriz ósea para activar las células osteoprogenitoras que sintetizan más BMP. Estudios han demostrado que las BMP-2, -4 y -7 son capaces de inducir la formación de hueso *in vitro* e *in vivo* en sitios ectópicos. Por otra parte, las BMP-1 y -3 incrementan la producción de Col-I y OCN de células osteoprogenitoras *in vitro*. La incorporación de BMPs en soportes porosos representan una de las estrategias terapéuticas más eficaces [75].
- Factores de crecimiento fibroblástico (FGFs): Estos estimulan la proliferación de las MSC, osteoblastos y condrocitos. Debido a su acción angiogénica mejoran el crecimiento de los tejidos. Entre estos, el FGF-2 o bFGF ha sido el más usado en aplicaciones de BTE [75].

- Factor de crecimiento similar a la insulina (IGFs): Promueve la proliferación de osteoblastos y condrocitos induciendo la producción de MEC mediante la síntesis de Col-I y la posterior mineralización de esta [75].
- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFs): Actúa como un factor quimiotáctico y mitogénico para los osteoblastos e incrementa la proliferación de estos. Sin embargo, a altas concentraciones puede influenciar la reabsorción ósea [75].
- Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ): Incrementan la proliferación de las MSC, osteoblastos y condrocitos, sin embargo, al igual que los PDGFs, a ciertas concentraciones puede influenciar la reabsorción ósea por lo que juega un papel en el acople entre la formación y la reabsorción ósea [75].

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 3.1 HIPÓTESIS

Soportes desarrollados a partir de Col-I y Col-I/HAp, aislados de origen bovino, que presentan microestructuras unidireccional *vs.* multidireccional tienen distinto potencial osteoinductivo y la orientación de sus poros puede influenciar la colonización de MSC y la subsecuente deposición de matriz extracelular ósea.

## 3.2 OBJETIVOS

### 3.2.1 Objetivo General

Desarrollar y evaluar el potencial inductivo de soportes bifásicos de Col-I/HAp constituidos por una capa microestructuralmente similar al hueso cortical y una capa similar al hueso esponjoso.

### 3.2.2 Objetivos Específicos

**3.2.2.1** Diseñar y fabricar soportes de Col-I e hidroxiapatita con microestructura externa unidireccional e interna multidireccional.

**3.2.2.2** Caracterizar las propiedades mecánicas, microestructurales, fisicoquímicas y biológicas de los soportes desarrollados.

**3.2.2.3** Evaluar *in vitro* el potencial osteoinductivo de los soportes desarrollados mediante el cultivo tridimensional de células madre mesenquimales.

**3.2.2.4** Evaluar *in vivo* el potencial osteoinductivo de los soportes desarrollados mediante un modelo animal.

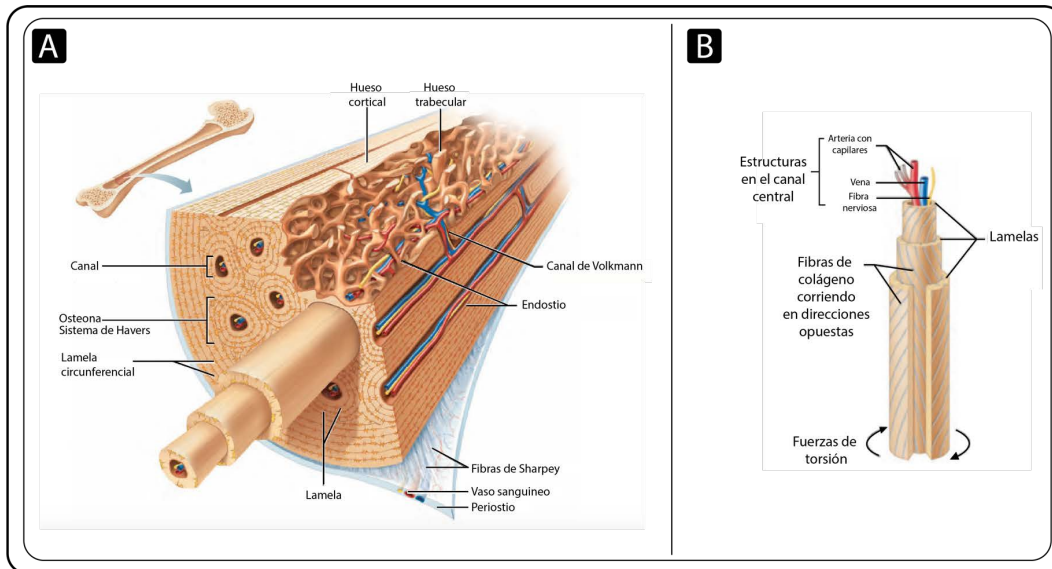


# 4. METODOLOGÍA

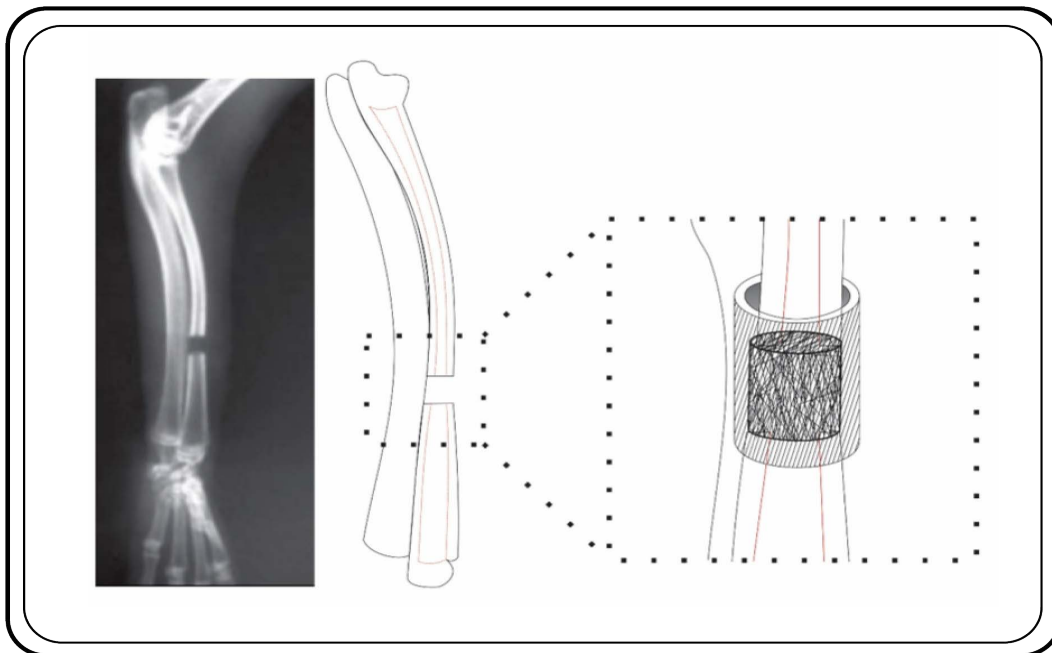
## 4.1 Metodología Objetivo 1

### 4.1.1 Diseño

El diseño de los prototipos para regeneración ósea desarrollado en este trabajo se basó en la composición nativa del hueso (Col-I/HAp) y en la direccionalidad que tienen las fibras de Col-I. El diseño contempla el uso del Col-I y la HAp con el fin de aprovechar sus ventajas biológicas y físicas como biomateriales. Estructuralmente hemos basado el diseño en la organización microestructural del hueso. El hueso cortical al ser el principal encargado de soportar las cargas mecánicas presenta una disposición estructural altamente organizada en la que las lamelas que conforman las osteonas (unidad estructural del hueso cortical) están formadas por fibras de colágeno que transcurren unidireccionalmente, característica fundamental que le permite soportar fuerzas de torsión (Fig. 11) [58]. El diseño microestructural de los soportes se basó en miras a ser empleado en un futuro en defectos óseos de tamaño crítico en huesos que normalmente sometidos a cargas mecánicas y en los cuales la incorporación de tejido blando, como músculo, en el sitio del defecto interviene en el proceso de regeneración. En la Figura 12 se describe el escenario inicialmente propuesto para la evaluación de los soportes. En este modelo los soportes multidireccionales actúan como estructura de llenado que encaja en el defecto óseo; mientras que los unidireccionales, rodean la lesión contribuyendo a estabilizarla, a evitar la incorporación de tejido blando y a permitir la formación de vasos sanguíneos y la difusión de oxígeno y nutrientes. Durante el proyecto se utilizaron dos composiciones (Col-I vs. Col-I/HAp) y orientaciones de poro (unidireccional vs. multidireccional) durante la producción de soportes que fueron comparados con el fin de identificar las mejores combinaciones posibles.

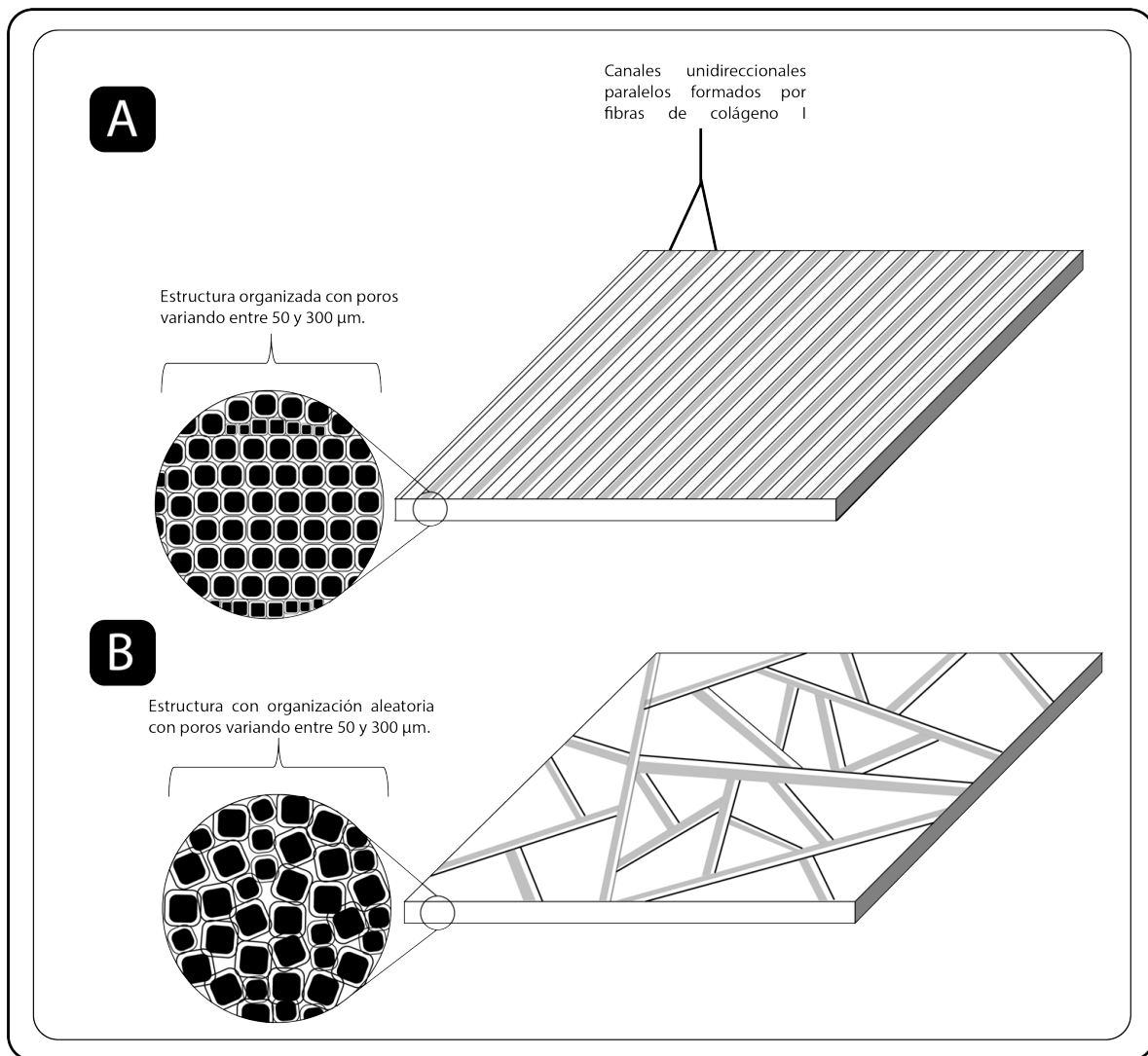


**Figura 11.** Ilustración de la organización estructural del hueso. Hueso cortical y esponjoso (A); organización de las lamelas y orientación de las fibras de Col-I en el hueso cortical (B). *Modificada de [58].*



**Figura 12.** Esquema de la prueba de concepto para la aplicación de soportes multi- y unidireccionales en defectos de tamaño crítico de radio de conejo Nueva Zelanda.

La orientación de las fibras/poros de los soportes laminares elaborados con diferentes composiciones de Col-I y ColII/HAp se muestra en la Fig. 13. Las muestras obtenidas pudieron ser manipuladas con facilidad durante todos los experimentos *in vitro* e *in vivo* (modelo ectópico) realizados. Los soportes fueron etiquetados de las siguiente forma: soportes de Col-I unidireccionales (UC); soportes de Col-I multidireccionales (MC); soportes de Col-I/HAp unidireccionales (UCH) y soportes de Col-I/HAp multidireccionales (MCH).



**Figura 13.** Esquema que muestra el diseño de soportes de Col-I y Col-I/HAp basados en la direccionalidad de las fibras de colágeno del hueso cortical y trabecular. Soportes unidireccionales con estructura porosa organizada y poros interconectados homogéneos (A); soportes multidireccionales con estructura porosa aleatoria con poros interconectados (B).

## 4.1.2 Fabricación de los Soportes

### 4.1.2.1 Aislamiento de Hidroxiapatita de Origen Bovino

El aislamiento y purificación de HAp a partir de hueso cortical bovino se realizó como trabajo conjunto enmarcado en uno de los objetivos específicos de la tesis de maestría titulada: “*Desarrollo de Soportes de Colágeno Tipo I con Partículas de Colágeno Tipo I - Hidroxiapatita, con Potencial Aplicación en Regeneración Ósea*” perteneciente al grupo GTIT-UNAL.

Se usó hueso cortical de fémur bovino como fuente de extracción de HAp, adaptando el método de hidrólisis alcalina descrito en [94]; a continuación se describe brevemente el procedimiento:

La diáfisis del fémur bovino se autoclavó en húmedo a 121°C con el fin de eliminar microorganismos y limpiar la superficie del hueso. Posteriormente se cortó en trozos pequeños y estos fueron pulverizados en un molino de bolas. El polvo obtenido se sometió a inmersión en nitrógeno líquido (-195.8°C) para reducir el tamaño de partícula. El hueso pulverizado se tamizó, con un tamaño de poro del tamiz de 1 mm, para iniciar el tratamiento químico a partir del polvo más fino. Se sumergió el hueso pulverizado en una solución de NaClO 2.5% por un periodo de 24h en agitación orbital a 140rpm, posteriormente se realizó un lavado con agua destilada por 24h y se calentó hasta ebullición en una solución de NaOH 2N durante 3h. Después, el material se incubó en una solución de NaClO 5% durante 6h. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se sumergió en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% por 24h. El proceso descrito anteriormente se llamó *purificación química* y corresponde a un ciclo de purificación. Las muestras se sometieron a 3 ciclos de purificación. Se sinterizaron a 1100°C por 3h. Después se lavaron con agua tipo. La HAp purificada se sometió a un tratamiento con molino de ágata por 15min para disgregar los aglomerados de HAp. Finalmente, el producto obtenido se caracterizó por microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos-X (DRX) (X'pert PRO - Malvern, Panalytical) y por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) Jasco 4100 (Jasco, Japón). En la Tabla 2 se presenta un resumen del proceso:

**Tabla 2.** Resumen tratamiento de hidrolisis alcalino para el aislamiento y purificación de hidroxiapatita de origen bovino (Tomada de [95]).

Nº	Tratamiento	Tiempo/Condiciones
1	NaClO 15%	24 h/140 rpm*
2	Centrifugación	15 min/3500 rpm+
3	Lavado agua tipo I	20 min/140 rpm*
4	Centrifugado	15 min/3500 rpm+
5	NaOH 5%	24 horas/60°C
6	Centrifugación	15 min/3500 rpm+
7	Lavado agua tipo I	20 min/140 rpm*
8	Centrifugación	15 min/3500 rpm+
9	NaClO 7.5%	6 h/140 rpm*
10	Centrifugación	15 min/3500 rpm+
11	Lavado agua tipo I	20 min/140 rpm*
12	Centrifugación	15 min/3500 rpm+
13	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15%	24 horas/140 rpm*
14	Centrifugación	15 min/3500 rpm+
15	Lavado agua tipo I	20 min/140 rpm*
16	Centrifugación	15 min/3500 rpm+
17	Calcinación	3 h/800° C
18	Lavados hasta pH ≈ 7.0	6 h/160 rpm*
19	Molino de ágata	15 min.

\*Agitación orbital; +Centrifugación

#### 4.1.2.2 Obtención y Purificación de Col-I

La obtención del Col-I se basó en los protocolos estandarizados de aislamiento y purificación a partir de fascia bovina realizada por el Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos (GTIT-UNAL). En la Tabla 3 se presenta un resumen del proceso:

**Tabla 3.** Descripción del proceso de purificación de Col-I. Tomada de [88].

<b>Preparación del material</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tejido bovino.</li> <li>• Eliminar tejidos adyacentes.</li> <li>• Fraccionar el tejido en secciones pequeñas.</li> <li>• Lavar con agua tipo II</li> </ul>
<b>Desengrase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavar con solventes</li> <li>• Eliminar solventes</li> </ul>
<b>Disolución Ácida</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionar álcali al sobrenadante hasta precipitación</li> <li>• Centrifugar y recuperar pellet</li> <li>• Lavar con agua tipo II</li> <li>• Centrifugar y recuperar pellet</li> </ul>
<b>Re-precipitación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionar al pellet solución salina</li> <li>• Agitar</li> <li>• Centrifugar y recuperar pellet</li> </ul>

<b>Lavados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionar agua tipo I</li> <li>• Agitar</li> <li>• Centrifugar y recuperar pellet</li> <li>• Ajustar a pH de estabilidad con solución ácida</li> </ul>
----------------	---

### 4.1.2.3 Elaboración de Soportes

Para la elaboración de soportes de Col-I se siguieron procedimientos establecidos por el grupo GTIT [88]. Sin embargo, se adaptaron para su aplicación en regeneración ósea. A continuación se describen los parámetros generales establecidos para cada tipo de soporte:

#### 4.1.2.3.1 Concentración de Col-I

Los soportes desarrollados en esta tesis fueran preparados con una dispersión (5 mg/g) de Col-I. Esta fue escogida porque ha sido usada en trabajos previos, incluidos los del GTIT-UNAL, en lo que se obtienen soportes con un tamaño de poro entre 50-350 $\mu$ m y una porosidad superior al 90% [88][96][97][98][99][100].

#### 4.1.2.3.2 Proporción Col-I/HAp

Los soportes de Col-I/HAp se prepararon en una proporción de Col-I/HAp 30%/70%, con el fin de imitar la composición natural de hueso [98]. Esto se hizo para mejorar las propiedades mecánicas de los soportes de Col-I, con el fin de que puedan ser utilizados en defectos de huesos largos.

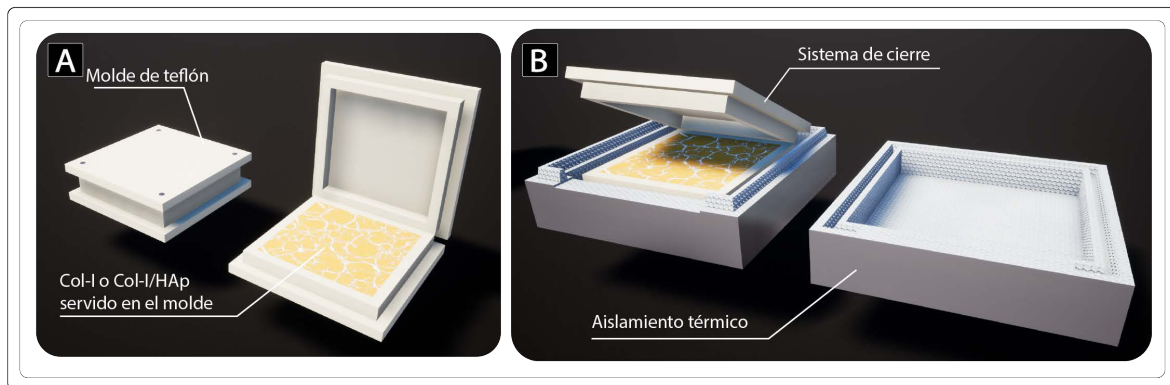
#### 4.1.2.3.3 Entrecruzamiento

Como agente entrecruzante se utilizó glutaraldehído (GTA) (BASF, Alemania) en un rango de concentración (0.02% – 0.3%) ya reportado [88][101][96][97]; las concentraciones utilizadas fueron: 0%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,3%. La citotoxicidad de estas concentraciones fue determinada en fibroblastos murinos L929 (85011425 - Sigma-Aldich®). El entrecruzamiento se realizó *in situ* para que las partículas de HAp se dispersaran homogéneamente en el colágeno y para evitar su sedimentación. El

procedimiento se realizó por 24h a temperatura ambiente y agitación orbital a 140rpm. A partir de los ensayos de citotoxicidad se escogió 0,02% de GTA como concentración de entrecruzaiento para todos los soportes.

#### 4.1.2.3.4 Fabricación de los Soportes

Se realizó por el método de congelación – liofilización. El sistema de congelamiento para la obtención de soportes unidireccionales está pendiente de protección de propiedad intelectual en forma de patente, por lo que los detalles del proceso de obtención de este tipo de soportes no pueden ser presentados en este documento. Por otra parte, los soportes multidireccionales se congelaron manteniendo la suspensión de Col-I o Col-I/HAp en una temperatura de -20°C por 24h. Para esto se usaron moldes de teflón (material antiadherente) (Fig. 14) desarrollados previamente por [88]. Después de congelar las suspensiones evaluadas, se liofilizaron por 48h (Virtis, SP Industries, USA) y se esterilizaron con óxido de etileno.



**Figura 14.** Modelo 3D del sistema de congelamiento para la elaboración de los soportes. Se muestran los moldes de teflón (material antiadherente) (A) y el sistema de aislamiento térmico (B) para la elaboración de soportes multidireccionales de Col-I y Col-I/HAp.

## 4.2 Metodología objetivo 2

### 4.2.1 Caracterización Mecánica

#### 4.2.1.1 Pruebas de Tensión

Las pruebas mecánicas de tensión se realizaron empleando una Máquina Universal de Ensayos Mecánicos AGS-X (Stable Micro System, Surrey, UK) siguiendo los lineamientos de la ASTM [102]; se empleó una celda de carga de 50kN a una tasa de



1mm/min a temperatura ambiente y piezas rectangulares secas en forma de “hueso de perro” de cada soporte (1mm ancho x 60mm largo x 2mm de grosor). Los ensayos se realizaron por triplicado y con ellos se recopilaron datos del módulo de elasticidad, elongación máxima y punto de ruptura a la tensión.

## 4.2.2 Caracterización Microestructural

### 4.2.2.1 Determinación de Porosidad

Para el cálculo del porcentaje de porosidad se relacionaron la densidad aparente del soporte y la densidad teórica del material de cada soporte (*Ecuación 1*) [103]. [103]. La densidad aparente se calculó a partir de la masa del soporte seco y el volumen del soporte hidratado, los cuales se obtuvieron usando una balanza digital ( $\pm 0.0001$  g) y un calibrador digital ( $\pm 0.01$ mm), respectivamente. La densidad teórica del colágeno se asumió como  $1.23\text{g/cm}^3$  [104] y  $3.156\text{g/cm}^3$  para la hidroxiapatita [105].

*Ecuación 1: Porcentaje de porosidad*

$$P = \left[ \frac{p \text{ soporte}}{p \text{ material}} \right] * 100 \quad [106]$$

Donde, *P soporte* representa a la densidad aparente del soporte y *P material* a la densidad de cada biomaterial (Col-I y/o HAp). Los análisis se hicieron por triplicado.

### 4.2.2.2 Tamaño de Poro

El tamaño de poro se evaluó siguiendo un procedimiento descrito por el grupo GTIT-UANL [88]. De cada soporte al azar se tomaron tres muestras (1cm x 2cm x 0,2cm), se prensaron a 900Kg por 15min y se cortaron longitudinal y trasversalmente para obtener cortes de  $\approx 100$   $\mu\text{m}$ . Las muestras se hidrataron en PBS (pH 7.4) por 24h para reconstituir nuevamente la microestructura porosa. Pasadas las 24h de hidratación, las muestras se observaron por microscopía de luz (Eclipse TS100, Nikon, Japan) a una magnificación de 10X. Las imágenes se capturaron usando una cámara digital (Sight DS-2Mv, Nikon, Japón)

incorporada al microscopio. Se realizaron medidas de  $\approx 100$  poros usando el método de intercepción lineal ya descrito [107]. El tamaño de poro ( $TP$ ) se expresó como el promedio de una elipse ajustada al poro medio. Para corregir el efecto de los poros que no se cortaron en su sección transversal máxima, el valor obtenido se multiplicó por 1,5 (*Ecuación 2*).

*Ecuación 2: Tamaño de poro*

$$TP = 1,5 * 2 \frac{\sqrt{a^2+b^2}}{2} \quad [107]$$

En la ecuación anterior,  $a$  representa al eje mayor y  $b$  al eje menor de la elipse que mejor se ajustó a cada poro. Los experimentos fueron repetidos tres veces.

#### **4.2.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM)**

Se evaluaron algunas características microestructurales de los soportes (interconectividad, direccionamiento y microtopografía) mediante ESEM (FEI QUANTA 200). Las imágenes representan tres campos de  $\varnothing 5\text{mm}$  seleccionados aleatoriamente en tres sitios diferentes de cada soporte. Los parámetros de adquisición utilizados fueron: 2.00 KV, spot=3.0, presión=100Pa, a magnificaciones de 75X, 150X, 300X y 3000X.

### **4.2.3 Caracterización Biológica**

#### **4.2.3.1 Biodegradabilidad**

Este parámetro se evaluó midiendo el periodo de tiempo transcurrido hasta la degradación total de los soportes expuestos a la acción enzimática de la colagenasa. Los soportes se secaron en un horno a  $37^\circ\text{C}$  por 3h y posteriormente se tomaron aleatoriamente tres piezas de cada uno de ellos con un peso de  $\approx 1.0\text{mg}$ . Después, las piezas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  50 mM en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 por 30min. Después, se adicionaron 2 mL de Tris-HCl – colagenasa (Sigma, USA) para una concentración final de 1 mg/mL (125 CDU) y se mantuvieron en incubación a  $37^\circ\text{C}$  y agitación a 80rpm por 12h, 24h y 48h. Para detener la acción enzimática en cada punto de tiempo se removieron los

soportes y se sumergieron en 0,5 mL de EDTA 0.25M mantenida en un balde con hielo. Luego, se lavaron 3 veces con agua destilada por 10min cada uno y se secaron en un horno (37°C, 3h) para luego registrar su peso y calcular el porcentaje de degradación ( $D$ ) de acuerdo a la siguiente formula:

*Ecuación 3: Porcentaje de degradación*

$$D = \left[ \frac{(W1-W2)}{W1} \right] * 100 \quad [108]$$

Donde,  $W1$  y  $W2$  son los pesos secos de las muestras antes y después de la acción enzimática.

#### 4.2.3.2 Reactividad biológica

Para la evaluación de la reactividad biológica (citotoxicidad) se adaptó el protocolo descrito en la norma ISO 10993-5 (parte 5: pruebas de citotoxicidad *in vitro*) [109]. Brevemente, la viabilidad celular se determinó mediante la reducción del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difenil bromuro de tetrazolio] por células metabólicamente activas de la línea celular de fibroblastos murinos L929 (85011425 - Sigma-Aldich®). En cada análisis se usó DMSO 50% como control positivo y silicona 0,2 g/mL como control negativo de citotoxicidad. Tres muestras de Ø5mm tomadas aleatoriamente de cada soporte se incubaron por 24h en medio de cultivo DMEM (11885084 – GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/mL (*medio completo*). Por otra parte, en cajas de cultivo de 96 pozos, se sembraron  $1 \times 10^4$  células L929/pozo en DMEM (11885084 – GIBCO) suplementado con SFB 10%, penicilina 100U/ml y estreptomycinina 100 µg/mL en 5 % CO<sub>2</sub>, 37°C y humedad relativa > 90 %. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado de cada pozo y las células fueron incubadas en las mismas condiciones con el medio condicionado por lo soportes. Adicionalmente se cultivaron células sin el medio condicionado, a las que se llamó *cultivo de referencia*. Terminada la incubación, el medio de extracción fue retirado y reemplazado con MEM sin rojo fenol (41061029 – Thermo Fisher) suplementado y se adicionó la

solución de MTT de acuerdo a las indicaciones del fabricante por 3h en condiciones estándar de cultivo. El formazán precipitado fue solubilizado con DMSO y la absorbancia (D.O.) de la solución fue leída en un lector de placas (Dynex, USA) a una longitud de onda de 560nm. El porcentaje de viabilidad celular (V.C.) fue correlacionado con la cantidad de formazán precipitado de acuerdo a la fórmula:

*Ecuación 4: Viabilidad celular*

$$V.C. = [E/B] * 100 \quad [109]$$

En la ecuación anterior  $E$  es el promedio de la absorbancia de la muestra y  $B$  es el promedio de la absorbancia del cultivo de referencia (cultivo de fibroblastos murinos L929 sin el medio condicionado por los soportes). Los experimentos se llevaron a cabo en triplicado.

## **4.2.4 Caracterización fisicoquímica**

### **4.2.4.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

Se tomaron tres muestras de  $\approx 2.0$  mg de cada soporte aleatoriamente. Posteriormente se obtuvieron los espectros FTIR usando un espectrofotómetro Jasco 4200 (Jasco, Japón) equipado con una celda de reflectancia total atenuada (ATR), a un intervalo espectral de 400 a 4000 $\text{cm}^{-1}$  y con una resolución de 4 $\text{cm}^{-1}$ , promediando 4000 escaneos.

### **4.2.4.2 Absorción de Agua**

Se tomaron aleatoriamente tres muestras de  $\text{Ø}5$  mm de cada soporte y se secaron en un horno a 37°C por 48h, para posteriormente, registrar su peso inicial ( $W_0$ ). A continuación, se sumergieron en 1 mL de PBS (pH 7.4) y se incubaron a 95% de humedad relativa a 37°C. Los soportes se retiraron del PBS cada 5 min durante los primeros 30 minutos, cada 10 minutos las siguientes 2 horas y, finalmente, a las 4 y 8 horas. Los soportes, sin presionarlos, se colgaron sobre un soporte diseñado para este fin hasta no

observar goteo alguno proveniente de los mismos. En cada punto de tiempo se registró el peso del soporte hinchado ( $W_e$ ) [110].

El porcentaje de hinchamiento de los soportes se calculó a partir de la siguiente ecuación:

*Ecuación 5: Porcentaje de hinchamiento*

$$E_{sw} = \left[ \frac{(W_e - W_o)}{W_o} \right] * 100 \quad [110]$$

En la ecuación  $W_o$  es el peso inicial del soporte seco,  $W_e$  es el peso del soporte hinchado y  $E_{sw}$  es el porcentaje de hinchamiento en el equilibrio.

### 4.3 Metodología Objetivo 3

#### 4.3.1 Ensayos de Bioactividad con Células Madre Mesenquimales Humanas Aisladas de Gelatina de Wharton (hWJ-MSC)

##### 4.3.1.1 Asilamiento de hWJ-MSC

El proceso de aislamiento y caracterización de las hWJ-MSC fue llevado a cabo por el Instituto de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (ICDBIS) - Unidad de Terapia Avanzada, Bogotá, Colombia. Se colectaron cordones umbilicales después de la selección de mujeres embarazadas, jóvenes, sanas y sin complicaciones durante el parto, bajo su consentimiento informado. Las muestras frescas se transfirieron inmediatamente a las instalaciones de procesamiento en recipientes estériles cargados con PBS (pH 7.4), suplementado con penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/mL. Se separó mecánicamente la gelatina de Wharton (WJ) del tejido y se transfirió a placas de 100mm en DMEM suplementado con 10% de lisado de plaquetas humanas (hPL), penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/mL e incubado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo se reemplazaron cada tercer día hasta que las células alcanzaron una confluencia del 70-80%.

##### 4.3.1.2 Caracterización de las hWJ-MSC

La caracterización de las células se hizo siguiendo las recomendaciones del Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia

Celular [111]. Se evaluó la adherencia al plástico de las hWJ-MSC, así como su diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*. También se evaluó por citometría de flujo la expresión de los siguientes marcadores de superficie: *CD73*, *CD90*, *CD105* y *HLA –ABC* y se confirmó que las células no expresaran los marcadores hematopoyéticos *CD4* y *CD45*.

### 4.3.1.3 Ensayo de Adhesión Celular a los Soportes

Para este ensayo se usaron hWJ-MSC que expresan proteína fluorescente verde (GFP) obtenidas mediante el uso de lentivirus como vector de transferencia génica de acuerdo a [112]. Se cultivaron estas células en pasaje 4 en monocapa con DMEM (11885084 – GIBCO) suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/mL y se incubaron a 37°C , 5% CO<sub>2</sub> y humedad > 90 %. Una vez alcanzaron un 80% de confluencia se trataron con tripsina-EDTA 0.25% (25200072-GIBCO) y se contaron mediante tinción vital con azul de tripano. Posteriormente se sembraron las células en cada esponja (*n*=3) a una densidad de 3 x 10<sup>4</sup> células/soporte(Ø 5mm El método de siembra de elección fue el descrito por [113], realizando la siembra bajo agitación orbital durante 1h y posteriormente transfiriendo los soportes a una caja de cultivo de 96 pozos y manteniéndolos en condiciones estándar de cultivo celular por 10 días. La evaluación de la capacidad de adherencia (cualitativa) de las células en cada tipo de soporte se realizó mediante microscopia de fluorescencia y por ESEM.

### 4.3.1.4 Proliferación de hWJ-MSC

La proliferación de las hWJ-MSC en cada tipo de soporte se evaluó mediante la técnica de MTT (Vybrant MTT Cell proliferation Assay Kit TM - Invitrogen V-13154), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células fueron incubadas (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>, humedad >90%) con DMEM (11885084 – GIBCO) suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/mL hasta que alcanzaron una confluencia de 80%. Después de disgregarlas con tripsina y contarlas con azul de tripano, en cada soporte (*n*=3) se sembraron 3x10<sup>3</sup> células/Soporte (Ø 5mm) y se incubaron por diferentes tiempos. En los días 0, 1, 4, 7 y 14 el medio de cultivo fue reemplazado por la solución de MMT (1

mg/mL) y las muestras incubadas por 4h. Después, se retiró el MTT y se colocó el DMSO para solubilizar el formazán. Posteriormente, se tomaron alícuotas de cada muestra y su absorbancia fue medida (560nm) en un lector de placas (Dynex, USA). Los valores obtenidos en cada tiempo fueron interpolados en una curva estándar elaborada con concentraciones celulares conocidas.

#### **4.3.1.5 Biocompatibilidad de los Soportes**

Se evaluó la capacidad de las hWJ-MSCs de infiltrarse y remodelar cada tipo de soporte, en ausencia y presencia de factores osteogénicos. Cultivos obtenidos sembrando  $5 \times 10^5$  células en pasaje 4 en fragmentos ( $\varnothing$  5mm) de cada uno de los soportes ( $n=3$ ) fueron incubados en DMEM (11885084 – GIBCO) suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o en medio osteogénico (A1007201 – GIBCO) suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Después de incubar a diferentes tiempos (7, 14 y 28 días) los soportes fueron procesados para análisis histológico y teñidos con hematoxilina y Eosina (H&E) siguiendo metodología descrita [114].

#### **4.3.1.6 Diferenciación Osteogénica *in vitro***

La diferenciación osteogénica fue valorada histoquímicamente y colorimétricamente. Para obtener los cultivos, en cada soporte ( $\varnothing$  5mm) se sembraron  $5 \times 10^5$  células en pasaje 4. Los cultivos fueron incubados por diferentes tiempos con DMEM (11885084 – GIBCO) suplementado con SFB 10%, penicilina 100U/ml, estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o con medio de diferenciación osteogénica (A1007201 – GIBCO) suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En los días 7, 14 y 28 de cultivo se tomaron las muestras para obtener las secciones que fueron teñidas con Rojo de Alizarina (RA) 40mM pH: 4,1 para la detección de depósitos de calcio [114]. Paralelamente, se realizó un ensayo de mineralización a 28 días de acuerdo al método reportado por [115]. Brevemente, se adicionó el RA y se incubó en agitación suave durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de colorante. Posteriormente, los soportes con las células se transfirieron a tubos de 5 mL y se lavaron con 4 mL de agua

destilada en agitación orbital a 140rpm. Se realizaron lavados hasta que dejó de haber liberación evidente del colorante. Se fotografiaron los soportes con un estereoscopio. Luego, se procedió a la extracción del color. Para ello, se añadieron entre 100 y 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético (10% v/v) a las muestras y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron 100 $\mu\text{L}$  por muestra a una placa de 96 pocillos para leer la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placas (Dynex, USA). A los valores obtenidos se les restó las absorbancias de soportes vacíos empleados como controles en cada condición. Los experimentos fueron hechos por triplicado.

### **4.3.2 Ensayos de Bioactividad con Células Madre Mesenquimales de Rata Aisladas de Médula Ósea (rBM-MSC)**

#### **4.3.2.1 Aislamiento de rBM-MSC**

Las rBM-MSC se obtuvieron de ratas Wistar machos jóvenes (Charles River Laboratories, Écully, Francia), estabulados en las instalaciones del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND) de Málaga, España. Los animales fueron sacrificados por inhalación de sevoflurano y posterior dislocación cervical. Se extrajeron los fémures, los cuales se mantuvieron en medio DMEM frío suplementado con SBF 10%, L-glutamina 2.5 mM, penicilina 300 U/ml, estreptomina 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y fungizona 1.5% (medio con 3x antibióticos) durante 15 minutos. En condiciones asépticas, se cortaron las epífisis de los huesos y se extrajo la médula ósea de las diáfisis perfundiéndolas con medio DMEM con SBF 10%, L-glutamina 2.5 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y fungizona 0.5% (medio completo). El material obtenido se disgregó haciéndolo pasar repetidas veces por una aguja de 22G y se filtró a través de un cell strainer para retirar los restos de material sólido. Las células obtenidas se cultivaron en condiciones estándar, en medio completo normal, con cambios de medio frecuentes para seleccionar las células por adherencia al plástico.



### 4.3.2.2 Adhesión de rBM-MSC a los Soportes

Se cultivaron rBM-MSC en pasaje 3 hasta alcanzar una confluencia del 80%; luego, los cultivos fueron digeridos con tripsina-EDTA 0.25% (25300062 - GIBCO) y las células fueron contadas mediante tinción vital con azul de tripano. Después de sembrar los soportes con  $2,5 \times 10^3$  células/soporte ( $\varnothing$  5mm) ( $n=3$ ) (como control se usó el producto comercial - Helistat®), se adicionó 5-clorometilfluoresceína (CMFDA) - *CellTracker™ Green* (C2925 – Thermo Fisher) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta tinción permite rastrear las células con estereoscopia de fluorescencia hasta por 72h, porque atraviesa libremente la membrana celular y es modificada por la célula de tal manera que no puede abandonarla. Después de incubar por 45 min, los cultivos fueron observados con un estereoscopio de fluorescencia y las imágenes obtenidas fueron procesadas usando el software Image J - FIJI 1.39u (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

### 4.3.2.2 Proliferación de rBM-MSC Sobre los Soportes *in vitro*

La proliferación de las rBM-MSC en cada uno de los soportes fue determinada con MTT (Cell growth determination kit – CDG1-1KT-Sigma-Aldrich®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Soportes sembrados con  $1 \times 10^3$  células/soporte ( $\varnothing$  5mm) ( $n=3$ ) fueron incubados ( $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ) con DMEM suplementado con SFB 10%, L-glutamina 1,25%, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Después de alcanzar 80% de confluencia se disgregaron con tripsina-EDTA 0.25% (25200072-GIBCO), se contaron y se sembraron ( $1 \times 10^3$  células/soporte) en cada uno de los soportes ( $\varnothing$  5mm) ( $n=3$ ). Después de solubilizar con isopropanol el formazán producido por las células vivas, se obtuvieron lecturas de absorbancia en los días 0, 3, 7 y 10 con un espectrofotómetro de placas a 520nm. Los valores obtenidos fueron comparados con una curva patrón con concentraciones celulares conocidas. Los experimentos fueron realizados por triplicados.

### 4.3.2.3 Diferenciación Osteogénica *in vitro* de las rBM-MSC

#### 4.3.2.3.1 Actividad ALP de las rBM-MSC en Monocapa

La fosfatasa alcalina (ALP) es un marcador temprano de diferenciación osteogénica. Se midió su expresión por las rBM-MSC bajo la influencia de las citoquinas BMP-2, FGF-2, VEGF, BMP-2+VEGF y BMP-2+FGF-2. Inicialmente las rBM-MSC se

cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de  $1 \times 10^3$  células en DMEM (D5671 – SIGMA), SFB 2%, L-glutamina 1,25%, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En cada caso, se cuantificó la actividad ALP usando el Kit SIGMAFAST™ *p*-nitrophenyl phosphate tablets” (Sigma-Aldrich®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El procedimiento involucró la disolución de una pastilla proporcionada por el kit para obtener un tampón Tris 0,2M y una pastilla de *p*NPP en 20 mL de agua milliQ. Los cultivos se incubaron en las condiciones anteriormente descritas y en los días 3, 4 y 7 se les adicionó 2, 10 y 20 ng/mL de cada factor. Transcurridos 10 días se retiró el medio de cultivo de los pozos, se lavo dos veces con 200 $\mu\text{L}$  de PBS (pH 7.4), se agregaron 100 $\mu\text{L}$  de la solución de *p*NPP y se incubó durante 20 min a 37°C. La reacción se detuvo con 100 $\mu\text{L}$  NaOH 1M y se registró el tiempo de reacción (*TR*). La absorción del producto amarillo resultante se midió a 450nm en un espectrofotómetro de placas. Con los valores de absorbancia obtenidos se calculó la actividad ALP (U/L) de acuerdo a la siguiente fórmula:

*Ecuación 6: Medición de ALP*

$$ALP(U/L) = \left[ \frac{(Abs/TR) * Vol.E * 1000}{18,8 * Vol.M * PL} \right]$$

Donde, *Abs* es la absorbancia; *TR* es el tiempo de reacción; Vol. E es el volumen total en cada pocillo (0.1 mL en placas de 96 pocillos). En este caso debido a la adición de 100 $\mu\text{l}$  NaOH 1M el volumen de muestra fue 0.2 mL; 1000 es el factor de conversión a U/L; 18,8 es el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol; Vol. *M* es el volumen de muestra.

La actividad ALP se normalizó en base al número de células/soporte. El número de células se obtuvo mediante el ensayo metabólico XTT 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfonil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida (Cell Proliferation Kit II, Roche) basado en la capacidad celular de reducir sales de tetrazolio. El XTT de color amarillo al ser educido por las células genera un producto de color naranja el cual se midió mediante un lector de placas a 450nm. Los experimentos se llevaron a cabo con un  $n=6$ .

### 4.3.2.3.2 Actividad ALP de las rBM-MSc en los Soportes

Una vez determinada la concentración de cada citoquina en el ensayo en monocapa descrito anteriormente, se seleccionaron las siguientes concentraciones: BMP-2 200 ng/mL, VEGF 20 ng/mL y FGF-2 10 ng/mL como las concentraciones a emplear de estos factores para estimular a las rBM-MSc sembradas en cada tipo de soporte ( $n=6$ ) a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/soporte ( $\varnothing 5\text{mm}$ ). Posteriormente, se cuantificó la actividad ALP siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para el cultivo en monocapa. Sin embargo, en este caso el número de células se cuantificó en relación a la cantidad de DNA (ng) en cada soporte mediante el kit *Quant-iT™ PicoGreen™* dsDNA Assay Kit (Thermo Fischer), siguiendo las indicaciones del fabricante. El reactivo interacciona de forma específica con DNA formando un complejo que al ser excitado a 480nm emite una señal fluorescente que se puede medir mediante el uso de un fluorímetro a 520nm. El DNA se cuantificó extrapolando los valores de fluorescencia en una curva de calibración elaborada con concentraciones conocidas de DNA.

## 4.4 Metodología Objetivo 4

### 4.4.1 Implantación

Se realizó un modelo de implantación ectópica intramuscular usando los soportes UC y MC en 20 ratas Wistar macho (10 semanas de edad, peso: 340g-350g), divididas en dos grupos. El primero de ellos (8 ratas;  $n=4$ ) (Tabla. 4) usado para análisis histológico y el segundo grupo (12 ratas;  $n=10$ ) (Tabla. 5) usado para la cuantificación de calcio como medida de la osificación *in vivo*. Los procedimientos quirúrgicos y el cuidado de los animales experimentales se realizaron de acuerdo a la legislación nacional española (RD53/2013) e internacionales (Directive 2010/63/EU), referentes a la protección de animales con propósitos de investigación científica y fueron aprobados por el comité de bioética del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND), España, en donde se realizó el alojamiento, los procedimientos quirúrgicos y el seguimiento postoperatorio. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (23°C) y ciclos de luz-oscuridad de 12h. La dieta fue suministrada *ad libitum*.

**Tabla 4.** Número de soportes a usar por tipo (UC; MC) y por tratamiento (C-; BMP-2; VEGF; BMP-2/VEGF) para el grupo 1: Histología.

	C-	BMP-2	VEGF	BMP-2/VEGF	Total Soportes/Tipo
<b>UC</b>	4	4	4	4	16
<b>MC</b>	4	4	4	4	16
<b>Total soportes/tratamiento</b>	8	8	8	8	32

**Tabla 5.** Número de soportes a usar por tipo (UC; MC) y por tratamiento (C-; BMP-2; VEGF; BMP-2/VEGF) para el grupo 2: Cuantificación de calcio

	C-	BMP-2	BMP-2/VEGF	Total Soportes/Tipo
<b>UC</b>	4	10	10	
<b>MC</b>	4	10	10	
<b>Total soportes/tratamiento</b>	8	20	20	48

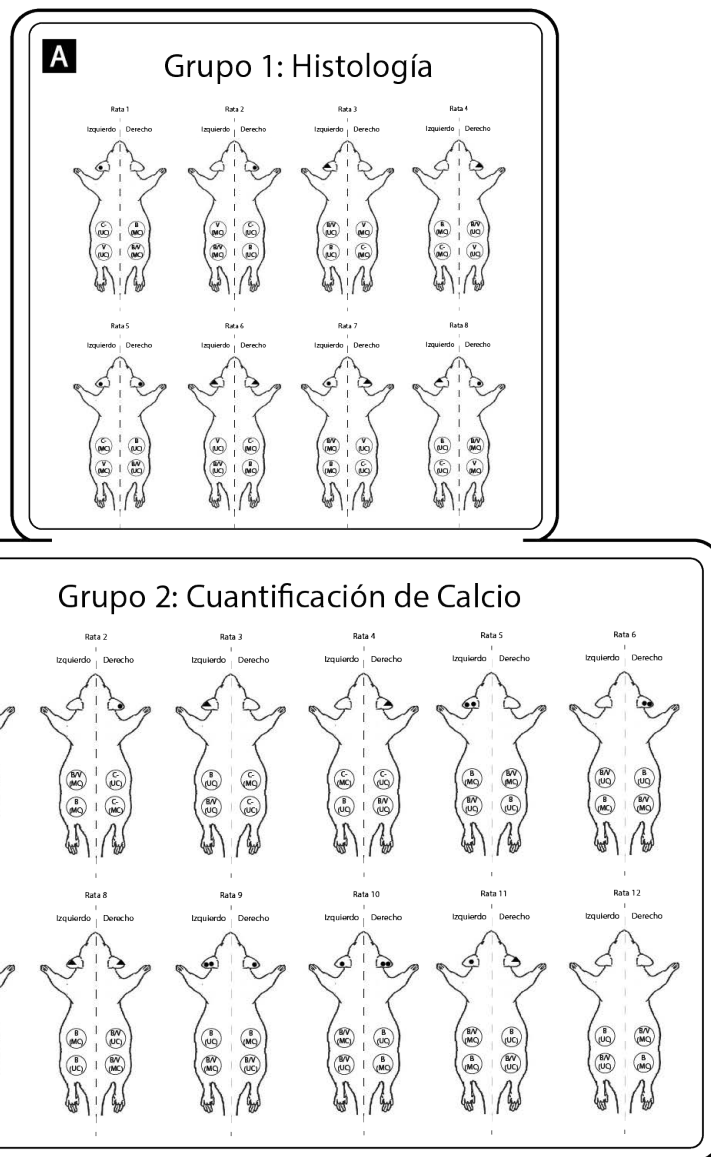
Soportes de Ø5mm y 1mm de grosor fueron cargados con las citoquinas BMP-2 (500ng), VEGF (50ng) y la combinación de estas BMP-2/VEGF contenidos en 10µL de 4mM HCL+BSA 0,1% y PBS (pH: 7.4)+ BSA 0,1%, respectivamente. Como control negativo se usaron soportes sin citoquinas cargados con la solución de dilución respectiva, como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Carga de citoquinas en los soportes T1 (carga en tiempo 1) y T2 (carga en tiempo 2).

Soporte	Carga T1	Carga T2
<b>C-</b>	10µL HCL/BSA	10µL PBS/BSA
<b>VEGF</b>	10µL HCL/BSA	10µL VEGF (50ng)
<b>BMP-2</b>	10µL BMP-2 (500ng)	10µL PBS/BSA
<b>BMP-2+VEGF</b>	10µL BMP-2 (500ng)	10µL VEGF (50ng)

Como analgesia preoperatoria en cada animal se inyectaron subcutáneamente 15µL de hidrocloreuro de buprenorfina (Buprecare 0,3 mg/mL, Divasa-Farmavic S.A.) 30min antes de la cirugía. Luego de suministrarles sevofluorano (SevoFlo – No. 4456) por inhalación, se rasuraron en la región dorsal inferior a la altura de las extremidades posteriores. Luego de limpiar con alcohol etílico (70%), se hizo una incisión central para exponer los músculos dorsales (*gluteus maximus*). En los músculos expuestos se realizó una incisión (≈8mm) para crear bolsillos en los que se depositaron los implantes. La

implantación de los soportes con las citoquinas se realizó siguiendo un esquema de permutaciones aleatorias entre los cuatro grupos experimentales (control negativo: C-; VEGF: V; BMP-2: B y BMP-2/VEGF: B/V) para cada rata del estudio de acuerdo a la Figura 15. Una vez depositados los soportes con las citoquinas, los bolsillos se cerraron con punto de sutura simple hecha con sutura sintética no absorbible (56348-12U, Lorca Marín) para identificar los sitios de implantación después de 21 días, tiempo en el cual se extrajeron. Finalmente, se suturó la piel usando sutura sintética absorbible (32346-N36U, Lorca Marín) y la herida se cerró con grapas quirúrgicas (BN512R – AESCULAP®).



**Figura 15.** Esquema de implantación de los soportes en el modelo ectópico intramuscular en rata. Análisis histológico (A) y cuantificación de calcio (B).

Durante el postoperatorio los animales experimentales fueron mantenidos en estabulario bajo condiciones de temperatura controlada (23°C), ciclos de luz-oscuridad de 12h y dieta suministrada *ad libitum*. Durante los primeros 3-4 días se suministró el analgésico buprenorfina (300 µL / 100 mL), luego, la dosis se disminuyó progresivamente de acuerdo al comportamiento de los animales. Los animales fueron supervisados continuamente durante el periodo postoperatorio monitoreando peso, condición corporal, consumo de agua, consumo de alimento, movilidad, inflamación, tumefacción y temperatura.

#### 4.4.2 Procesamiento Histológico

Después de 21 días de implantación *in vivo* se colectaron los implantes para su procesamiento histológico. Los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>; después de revisar la ausencia de respuesta a estímulos en el animal, se retiraron las grapas y los puntos externos e internos y se extirparon los implantes. Estos se depositaron en formalina tamponada 4% por 24h y luego se sometieron a decalcificación (Histofix® decalcifier 2 for clinical diagnosis - 256238.1211), empleando las condiciones descritas en la Tabla 7. Finalmente, los implantes fueron deshidratados e incluidos en parafina en un histoprocador (Leica TP 1020) siguiendo las indicaciones consignadas en la Tabla 8.

**Tabla 7.** Pasos del proceso de decalcificación. Los implantes que no contenían BMP-2 no se sometieron al decalcificador.

BMP-2; BMP-2/VEGF			C-; VEGF		
Tratamiento	Tiempo (min)	Ciclos	Tratamiento	Tiempo (min)	Ciclos
<b>PBS (pH 7.4)</b>	30	2	PBS (pH: 7.4)	30	2
<b>Histofix®</b>	90	2	Etanol 70%	30	2
<b>Etanol 70%</b>	30	2	Etanol 70%	almacenamiento	-
<b>Etanol 70%</b>	almacenamiento	-			

**Tabla 8.** Pasos del proceso deshidratación e inclusión de los implantes

Tratamiento	Tiempo (min)	Ciclos
-------------	--------------	--------

<b>Etanol 70%</b>	60	2
<b>Etanol 80%</b>	60	1
<b>Etanol 96%</b>	60	2
<b>Etanol 100%</b>	60	2
<b>Sub X</b>	30	3
<b>Parafina</b>	120	2

Finalmente se incluyeron los implantes en bloques de parafina y se cortaron a 7 $\mu$ m de grosor empleando un micrótomo (HM 360 - Thermo Scientific). Los cortes se montaron en portaobjetos silanados y se dejaron secar a 37°C por 24h. Posteriormente, se sometieron a tinción con H&E siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 9 para su posterior montaje con resina hidrofóbica DPX.

**Tabla 9.** Protocolo de tinción con H&E.

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ciclos</b>
Xileno	10	2
Etanol 100%	10	2
Etanol 96%	10	2
Etanol 70%	10	2
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	10	1
Hematoxilina de Harris	5	1
Etanol 96% + Ac. Acético	5	1
H <sub>2</sub> O	5	1
Etanol 96%	5	1
Eosina hidroalcohólica	3	1
Etanol 96%	inmersiones breves	3
Etanol 100%	10	2
Xileno	10	2

### 4.4.3 Procesamiento para Cuantificación de Calcio

Después de 21 días de la implantación se recuperaron los implantes del grupo 2 para cuantificar la cantidad de calcio en cada implante usando el kit Calcium OCC (Cromatest - linear chemicals). Los implantes fueron tratados con NaCl 0,9% para retirar remanentes de sangre y colocados en HCl 10% (v/v) por 24h a temperatura ambiente. Los reactivos del kit se mezclaron en proporción 1:1 (200µL/muestra) en los pozos de una placa de 96 pozos; luego, se adicionaron 10µL de cada muestra diluida 1/5 en NaCl 0,9% (v/v) incluyendo un triplicado para una muestra de calcio de concentración conocida provista por el kit. Después de incubar por 5min a 37°C se leyó la absorbancia a 550nm, en un lector de placas. La cantidad de calcio por implante se calculó teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

*Ecuación 7: Cuantificación de contenido de calcio*

$$\text{Calcio} (mg) = \left[ \frac{(Abs M)}{(Abs E)} \right] * 10 \frac{mg}{dL} \cdot FD$$

En esta ecuación *Abs M* es el valor de absorbancia de la muestra, *Abs E* es la absorbancia del blanco y *FD* es el factor de dilución.

### 4.5 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk. Los datos se reportaron como la media aritmética ± desviación estándar (SD). Se usó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el test post-hoc de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando se obtuvieron valores de  $p \leq 0.05$ . El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS® 25 (IBM).



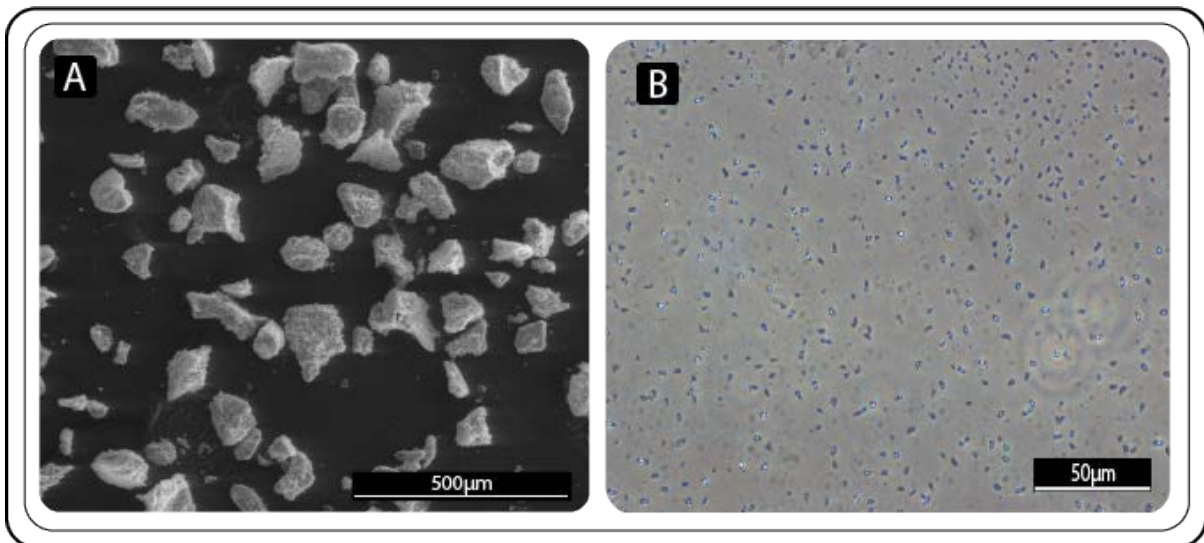
# 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 Resultados y Discusión objetivo 1

### 5.1.1 Obtención de HAp de Origen Bovino

Una vez estandarizado el proceso de aislamiento y purificación de HAp a partir de hueso cortical bovino mediante el método de hidrólisis alcalina, los cristales de HAp se caracterizaron por SEM, microscopía de luz (Figs. 16A y B), XRD (Fig. 17) y FTIR (Fig. 18). Las imágenes de SEM muestran cristales de HAp que forman aglomerados de gran tamaño superando las 200  $\mu\text{m}$  (Fig. 16A). Con el fin de dissociar los aglomerados se usó un tratamiento con molino de Ágata, después del cual se obtuvieron las partículas de HAp individuales que variaron en un rango de tamaño entre 5-15  $\mu\text{m}$  (Fig. 16B).

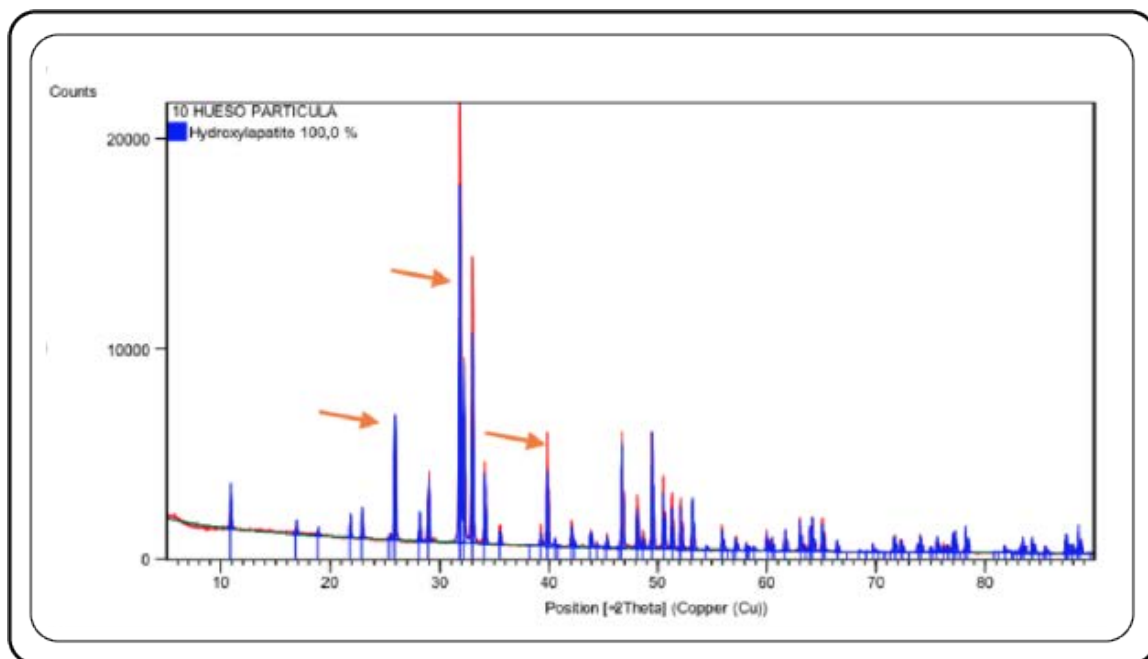
Los cristales de HAp exhibieron geometrías irregulares y ángulos pronunciados con microtopografía rugosa y porosa, características deseables para la producción de soportes para BTE ya que aumentan el área superficial del material y contribuyen a la adhesión y migración celular [116]. Esta microtopografía resulta de la descomposición de las sustancias orgánicas presentes en el hueso durante el proceso de aislamiento. Por otro lado, es posible que el tamaño de los cristales obedezca a la temperatura de calcinación (1100°C) y la formación de los aglomerados se deba a la absorción de energía de las partículas, ya que a mayor temperatura de calcinación, mayor absorción de energía y por ende mayor aglomeración de los cristales [116].



**Figura 16.** Micrografías de hidroxapatita aislada de hueso cortical bovino obtenida por el método de hidrólisis alcalina. SEM (A); microscopía de luz (B). *Modificada de [95].*

La fase cristalina y la estructura molecular de la HAp aislada se caracterizaron por DRX y FTIR, respectivamente. Los resultados de DRX indican que la estructura química de la HAp no se vio afectada por el proceso de aislamiento ya que el difractograma es semejante al del patrón estándar JCPDS 09-0432 de HAp (Fig. 17). En la muestra y en el patrón se observan tres picos principales correspondientes a los planos 211, 112 y 300 en  $2\theta = 31,8$ ,  $2\theta = 32,2$  y  $2\theta = 32,9$ , respectivamente. Estos resultados son concordantes con lo reportado por [19], quienes también identificaron picos en  $2\theta = 25,5$  para el plano 002; en  $2\theta = 34$  para el plano 202; en  $2\theta = 39,5$  para el plano 310; en  $2\theta = 41,5$  para el plano 222 y en  $2\theta = 49$  correspondiente al plano 213, que son característicos de la HAp pura y los cuales se pueden observar también en la figura 17 [116]. Lo anterior indica que el proceso de aislamiento no afectó la estructura cristalina de la HAp. El mismo autor [19] describe que la temperatura de calcinación puede afectar la estructura cristalina de la HAp, debido a que temperaturas cercanas a  $700^{\circ}\text{C}$  producen patrones de DRX con picos amplios y redondeados correspondientes a HAp con baja cristalinidad. En contraste, en temperaturas cercanas a los  $1100^{\circ}\text{C}$  la HAp genera patrones de difracción que contienen picos agudos y estrechos, indicativos de su alta cristalinidad. También se ha reportado que la presencia de grupos carbonato disminuye cuando se usan temperaturas de calcinación superiores a  $700^{\circ}\text{C}$ , lo que implica que la temperatura es un factor determinante para producir HAp altamente cristalina sin trazas de material orgánico amorfo [19].





**Figura 17.** Difractograma de DRX de la HAp obtenida de hueso cortical bovino. *Tomada de [95].*

La identificación de los grupos funcionales presentes en las muestras de HAp se realizó por FTIR. En el espectro obtenido por esta técnica, se observa un pico redondeado alrededor de los  $3402\text{cm}^{-1}$  que se atribuye al agua absorbida por la HAp. El modo de vibración característico del grupo  $-\text{OH}$  típicamente se observa a  $3570\text{cm}^{-1}$ ; sin embargo, no es claramente identificable en la muestra debido al solapamiento con la banda fuerte correspondiente a la absorción de agua a  $3402\text{cm}^{-1}$ . En  $1411$  y  $1639\text{cm}^{-1}$  se observan los picos correspondientes a las bandas de absorción producidas por el grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  que indican la presencia de iones de carbono en la muestra proveniente de la atmósfera. Finalmente, los intensos picos presentes en  $1026$ ,  $605$  y  $559\text{cm}^{-1}$  se pueden atribuir a la presencia de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por diferentes autores como [18] y [19], quienes han demostrado que los picos característicos para la obtención de HAp pura coinciden con los que se observan en el espectro de FTIR reportado aquí.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los análisis de DRX y FTIR se puede afirmar que la muestra obtenida corresponde a HAp con una estructura cristalina que no se vio afectada por el proceso de aislamiento por hidrólisis alcalina ni por la calcinación a  $1100^\circ\text{C}$ . La ausencia de trazas de material orgánico en las muestras, sugiere que el

proceso de hidrólisis alcalina es un método adecuado para la eliminación de proteínas como el colágeno y demás material orgánico presentes en el hueso [18].

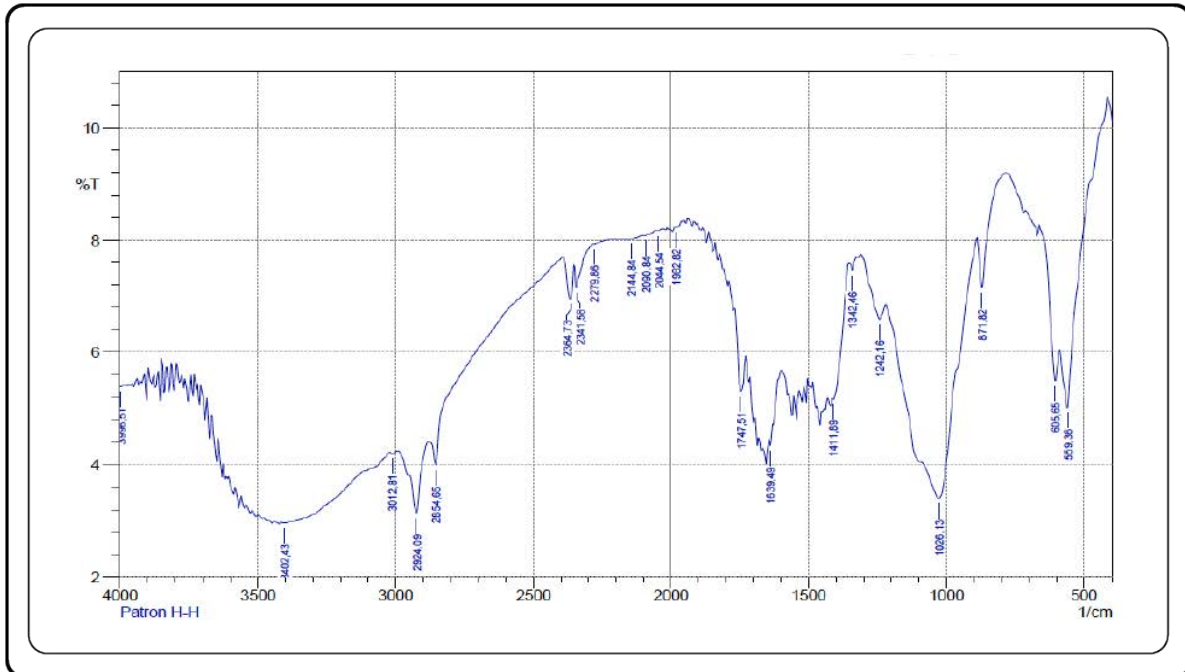
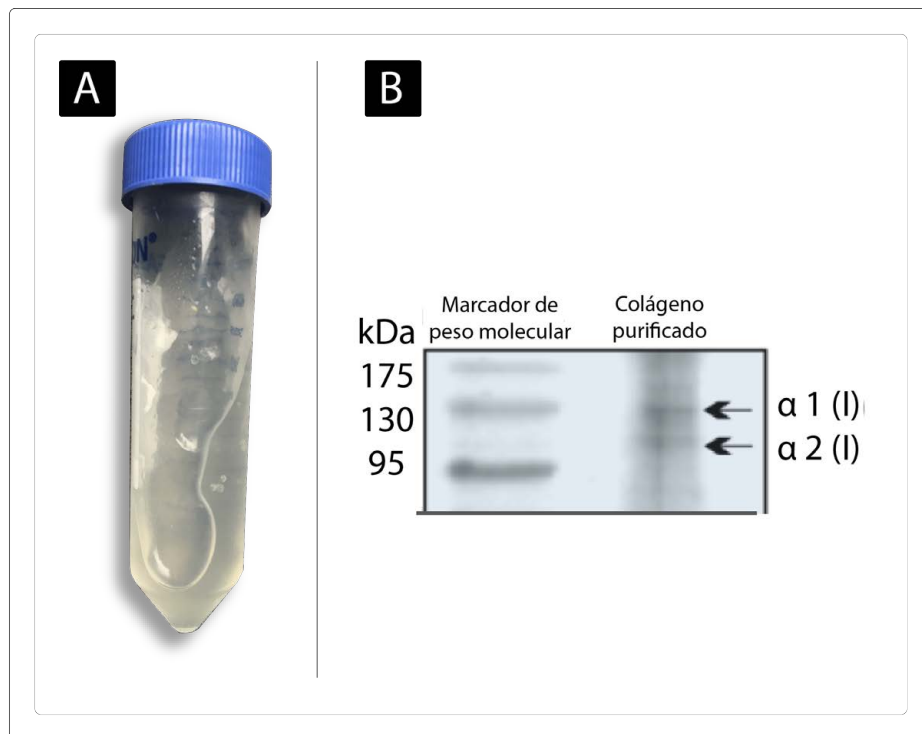


Figura 18. Espectro de FTIR de la HAp obtenida de hueso cortical bovino. Tomada de [95].

### 5.1.2 Obtención y Purificación de Col-I de Origen Bovino

El grupo GTIT-UNAL estandarizó el proceso de obtención y purificación de Col-I a partir de tendones de cola de rata [117]. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos se decidió emplear fascia bocina. El rendimiento del proceso de aislamiento de Col-I mejoró haciéndolo costo-efectivo. En este trabajo se usó este tejido para aislar el colágeno en consideración a que (1) la fascia bovina tienen poca grasa especialmente cuando se obtiene del lomo del animal, facilitando su limpieza; (2) a pesar que los productos bovinos pueden transmitir *encefalopatía espongiforme bovina* (EEB) a través de priones, la Organización Mundial de Salud (OMS) determinó que tejidos como los tendones y la fascia bovina están libres de estos agentes; (3) Colombia, lugar en el cual se obtuvieron las muestras de fascia, pertenece a los países en los que el riesgo de EEB es insignificante [118]; (4) el Comité Directivo Científico de la Unión Europea declaró que es seguro usar esta fuente para aplicaciones biomédicas y (5) se ha afirmado mediante estudios que los tratamientos a los

que se somete el tejido para la extracción del colágeno inactivan los posibles agentes infecciosos que puedan tener estos tejidos. Mediante el protocolo estandarizado por el grupo se obtuvo una dispersión coloidal viscosa (Fig. 19A) caracterizada en un trabajo previo del grupo realizado por [88]. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Fig. 19B), evidencia la presencia de las bandas características del Col-I pertenecientes a las cadenas  $\alpha I$  y  $\alpha II$ ; a 125 y 113KDa, respectivamente [88].



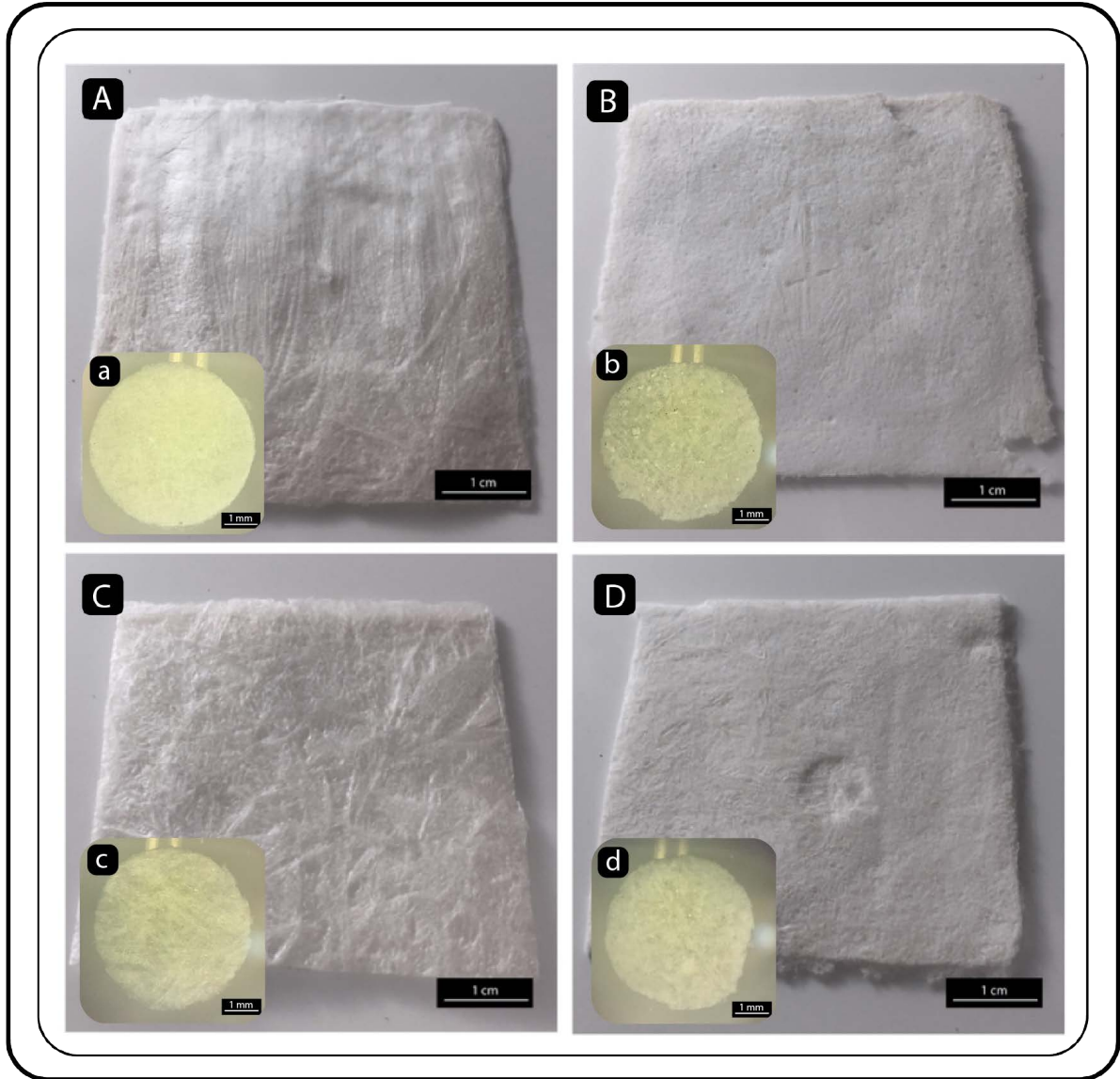
**Figura 19.** Obtención y caracterización de dispersión coloidal de colágeno tipo I. Fotografía de la dispersión coloidal de Col-I obtenida a partir de fascia bovina (A); SDS-PAGE para la identificación de las bandas características del Col-I (B). *Modificada de [88].*

### 5.1.3 Fabricación de los Soportes

Como se describió en la sección “Metodología objetivo 1: Diseño”, la prueba de concepto para la fabricación de los soportes en este trabajo se basa en la premisa de que el hueso cortical es capaz de soportar altas magnitudes de cargas mecánicas gracias a su composición orgánica-inorgánica y a su microestructura unidireccional lamelar. Por ende, con el fin de probar la influencia de estos parámetros (composición y direccionalidad) se

fabricaron soportes con microestructuras porosas mediante el método de congelación-liofilización en el que el agua actúa como porógeno. Se obtuvieron cuatro tipos de membranas llamadas **UC**: *Colágeno unidireccional*; **MC**: *Colágeno multidireccional*; **UCH**: *Colágeno/Hidroxiapatita unidireccional* y **MCH**: *Colágeno/Hidroxiapatita multidireccional*, todos elaborados con una concentración de Col-I de 5mg/g y entrecruzados con 0,02% de GTA. En el caso de UCH y MCH las membranas se fabricaron con una composición de Col-I/HAp del 30% y 70%, respectivamente; con el fin de imitar la proporción de Col-I:HAp del hueso nativo (Fig. 20A-D). A partir de estas membranas se obtuvieron piezas circulares de 5mm de diámetro x 2mm de grosor (Fig. 20a-d) usando un *sacabocados* dermatológico, las cuales fueron usadas para todas las pruebas *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, la microestructura (multi- y unidireccional) se obtuvo usando dos métodos de congelamiento descritos en la sección “Metodología”.

El método de fabricación permitió la obtención de soportes con microestructuras uni- y multidireccionales de Col-I y Col-I/HAp. Anteriormente se ha evidenciado que las estructuras orientadas pueden facilitar el efecto de guía por contacto, induciendo la orientación y elongación de las células que crecen en ellos; característica que puede ser empleada en regeneración de tejidos unidireccionales como nervio periférico, tendón y músculo, entre otros [88]. Pocos trabajos se han enfocado en el potencial de soportes unidireccionales par uso en BTE. Uno de ellos [119], resalta los beneficios de soportes elaborados con colágeno e HAp unidireccionados que imitan la microestructura del hueso, como mayor resistencia mecánica y propiedades osteoconductoras en comparación con soportes elaborados por métodos convencionales (sin direccionalidad). También, se ha reportado [120] un alto grado de infiltración celular tanto *in vitro* como *in vivo* en soportes con canales unidireccionales.



**Figura 20.** Fotografías de los soportes fabricados por el método de congelamiento-liofilización. UC: Col-I unidireccional (A); UCH: Col-I/HAp unidireccional (B); MC: Col-I multidireccional (C); MCH: Col-I/HAp multidireccional (D). Imágenes de espectroscopía de las piezas circulares de Ø5mm obtenidas de cada soporte laminar, usadas para las pruebas *in vitro* e *in vivo* (a-d).

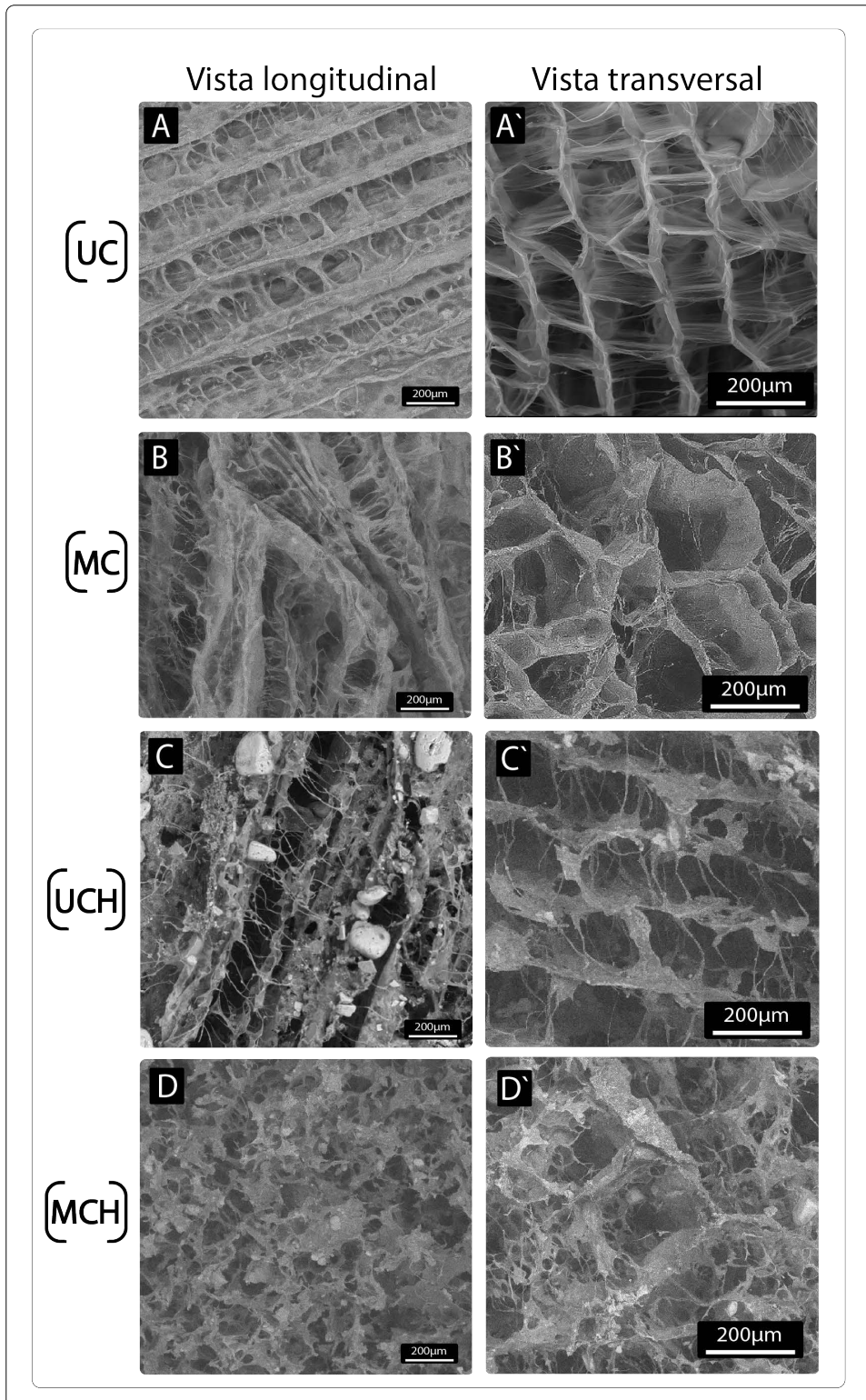


## 5.2 Resultados y Discusión Objetivo 2

### 5.2.1 Propiedades Microestructurales: Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM)

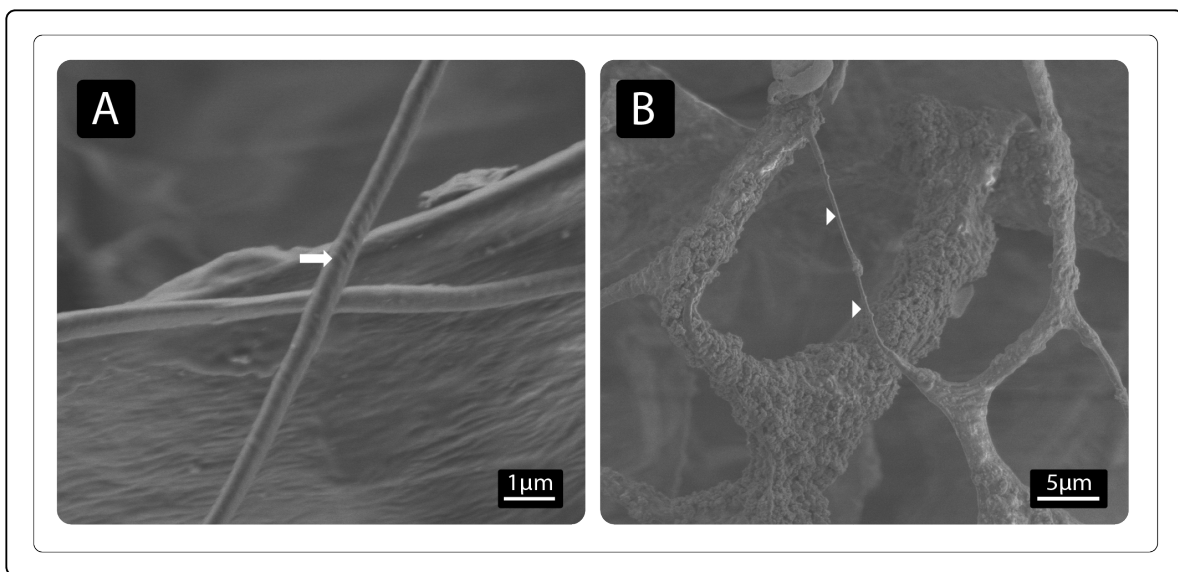
En las imágenes obtenidas por ESEM se pueden observar las características microestructurales de los soportes elaborados. Las imágenes longitudinales (Fig. 21A-D) de UC y UCH (Fig. 21A y 21C, respectivamente) se observan canales unidireccionales interconectados por finas paredes, que a su vez están conectadas por poros. En la superficie de los canales de UCH se observan aglomerados de HAp de ( $\approx 20-200 \mu\text{m}$ ) que permanecen en la superficie ya que por su gran tamaño no son capaces de incorporarse en la microestructura. En las imágenes longitudinales de MC (Fig. 21B) se observan canales formados por los cristales de hielo durante el proceso de congelamiento, que transcurren en varias direcciones. En MCH (Fig. 21D) la incorporación de HAp produce la pérdida de los canales longitudinales observados en MC y en cambio se ve una estructura porosa con una topografía rugosa. Las imágenes transversales (Fig. 21A' - D') muestran la morfología de los poros y la interconectividad de estos en todos los soportes. En todos los soportes se observan poros interconectados que son necesarios para la adhesión, crecimiento, proliferación, diferenciación y la difusión de productos de degradación y de desecho [121].

Este patrón desorganizado en los poros de soportes multidireccionales se debe a que la nucleación de los cristales de hielo durante el congelamiento no es controlada, de manera que siguen una distribución aleatoria formando poros de este tipo. En contraste, el congelamiento unidireccional permite controlar la nucleación de los cristales de hielo de manera que se genera una estructura altamente organizada en la que se consigue un patrón ordenado, como se observa en UC y UCH.



**Figura 21.** Imágenes de ESEM que muestran las características microestructurales de los soportes. Vista longitudinal, 150X (A-D). Vista transversal, 300X (A' - D').

Con el fin de determinar el grado de conservación estructural de las fibras de Col-I y la forma en que los cristales de HAp se asocian a estas, los soportes fueron analizados con microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) a magnificaciones de 21.000X y 8.000X, respectivamente (Fig. 22). En los soportes de Col-I se observan fibrillas que evidencian el ensamblaje característico de las triples hélices de esta proteína (Fig. 22A-*flecha*). Por otro lado, la mayoría de las fibras de los soportes de Col-I/HAp se ven recubiertas por los cristales de HAp; sin embargo, algunas quedaron sin recubrir (Fig. 22B –*puntas de flechas*).

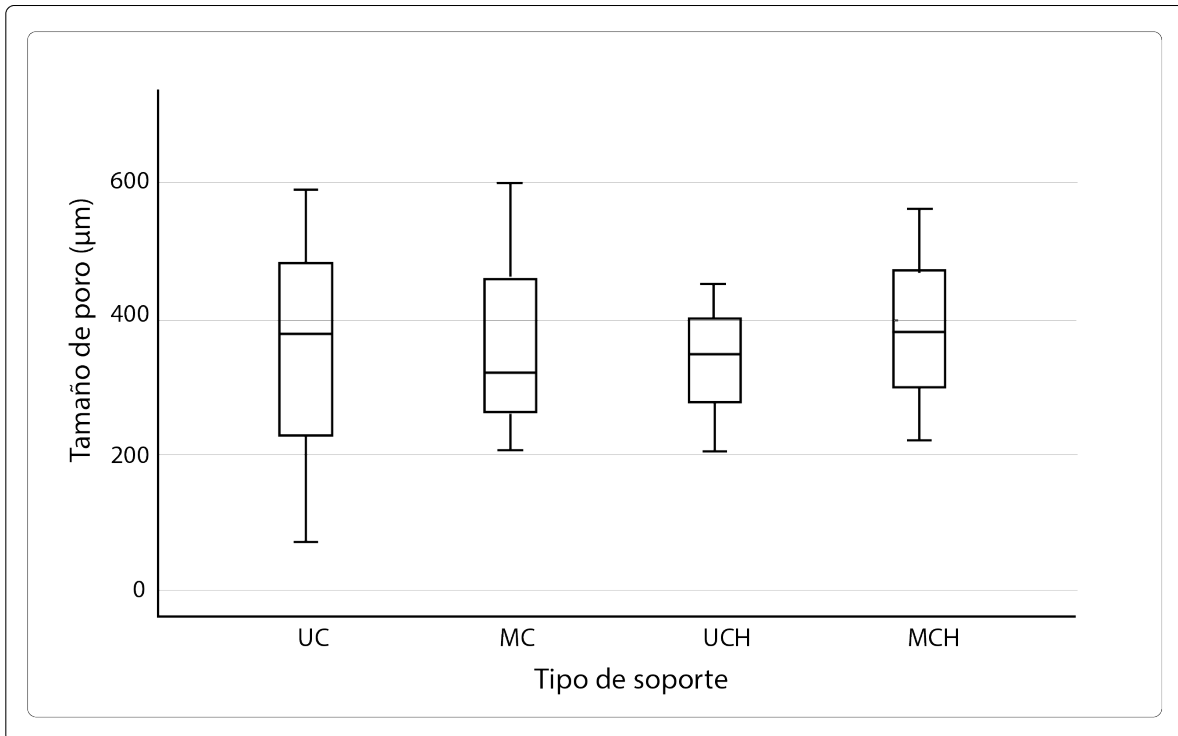


**Figura 22.** Imágenes de FESEM de los soportes. Se muestra la periodicidad característica del colágeno (*flecha*) en una fibrilla de un soporte de Col-I, 21.000X (A) y las fibras y fibrillas de Col-I recubiertas por HAp y zonas libres de recubrimiento (*puntas de flechas*), 8.000X (B).

### 5.2.2 Tamaño de Poro

Los datos de las mediciones del tamaño de poro, obtenidos por el método de intercepto lineal, son presentados en la Figura 23. No se encontraron diferencias significativas entre el tamaño de poro de los soportes UC, UCH, MC y MCH evaluados (Anexo 1). Lo anterior indica que los métodos de congelamiento empleados para obtener las microestructuras uni- y multidireccionales no afectan a este parámetro. En TE el límite inferior del tamaño de poro de un soporte está determinado por el tipo de células que se siembran en él, en esta tesis, se utilizaron MSC. Por su parte, el límite superior está

determinado por el área superficial disponible para la unión celular, ya que los poros deben aumentar la disponibilidad de ligandos requeridos para que ocurra una unión eficiente entre las células y el soporte [88]. Los soportes que se usan para regeneración ósea generalmente tienen tamaños de poro en el rango 100-300 $\mu\text{m}$ . Poros más pequeños (50-100 $\mu\text{m}$ ) impiden la penetración y formación de capilares favoreciendo condiciones hipóxicas, lo cual, induce la formación endocondral de hueso. Por otro lado, los poros más grandes (300-400 $\mu\text{m}$ ) favorecen la penetración de vasos sanguíneos y capilares que inducen la formación de hueso por vía intramembranosa [89]. El tamaño de poro de los soportes desarrollados en este trabajo fueron de:  $347 \pm 261 \mu\text{m}$  (UC);  $376 \pm 203 \mu\text{m}$  (MC);  $335 \pm 124 \mu\text{m}$  (UCH) y  $387 \pm 170 \mu\text{m}$  (MCH) que se encuentran en el rango de tamaño adecuado para promover la formación de vasos sanguíneos, la infiltración celular y la interacción célula-poro. Ya ha sido demostrado que soportes con tamaños de poro menores a 75  $\mu\text{m}$  solo permiten la infiltración de tejido fibroso, que soportes con poros entre 75-100  $\mu\text{m}$  promueven el crecimiento interno de tejido osteoide sin mineralizar y que soportes con poros de tamaños superiores a 100  $\mu\text{m}$  son los únicos que favorecen el crecimiento y formación de tejido óseo [122][123][124]. Aunque la direccionalidad de las fibras de colágeno en los soportes y la composición no son factores que afectan significativamente el tamaño de poro, la dispersión de los datos en los soportes con HAp fue menor que en los soportes de Col-I. Esto sugiere que la incorporación de HAp en los soportes disminuye la variación del rango de tamaños de poro, lo cual, puede deberse a que su presencia modifica el proceso de nucleación de los cristales de hielo (porógeno) durante el congelamiento, restringiendo su formación y en consecuencia manteniendo un rango de tamaño más estrecho que en los soportes sin HAp; en los cuales, la nucleación puede darse sin la restricción física impuesta por este mineral; obteniéndose poros en un rango de tamaño más variable.

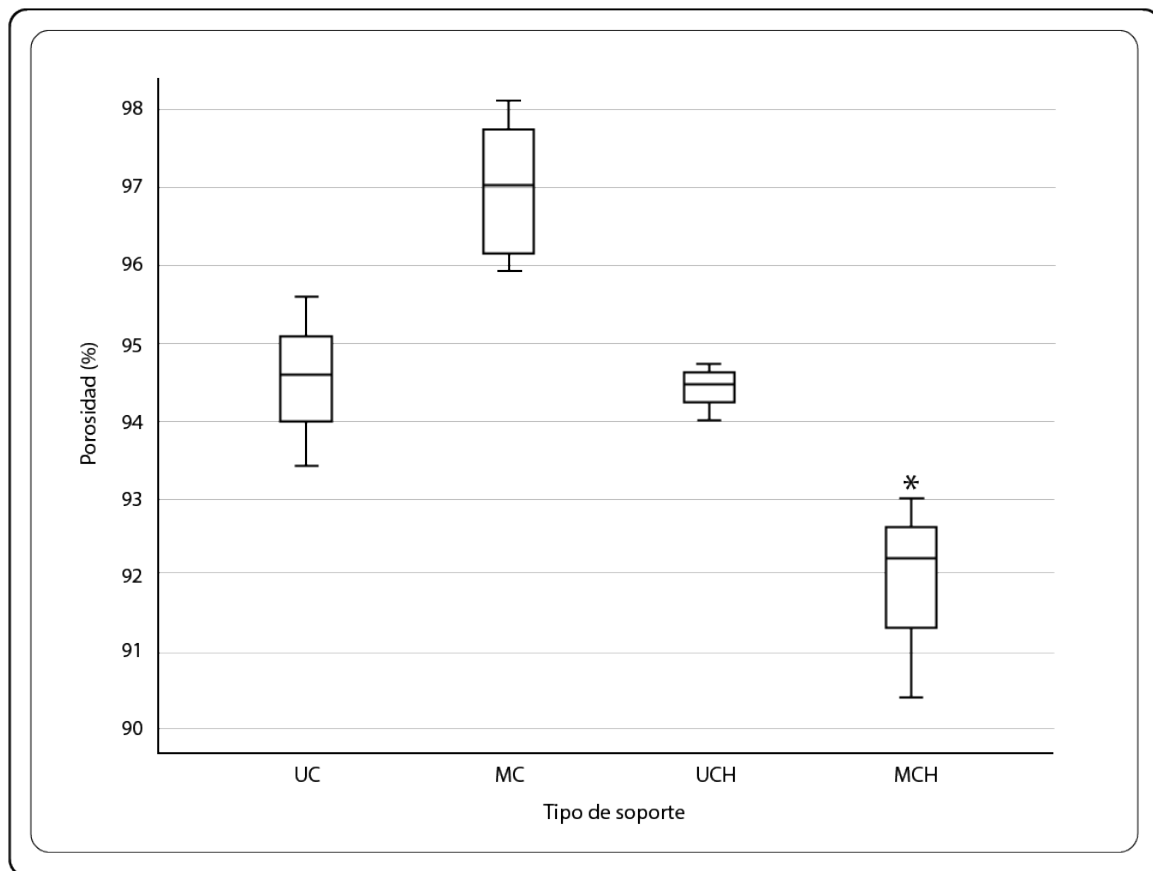


**Figura 23.** Box-plot del tamaño de poro de los soportes. ( $n=3$ );  $*p \leq 0.05$ .

### 5.2.3 Porosidad

La porosidad es un parámetro de gran importancia en el diseño de soportes para TE porque determina la distribución espacial de las células, nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento, afectando directamente la viabilidad del nuevo hueso formado. Las estructuras altamente porosas facilitan la migración y proliferación de las células, brindando un ambiente propicio para el transporte de masa, nutrientes, oxígeno y productos metabólicos. Además, estas estructuras ofrecen un área superficial interna alta que permite la adhesión y proliferación celular [75]. Los soportes desarrollados en este trabajo son altamente porosos (>90%). No se observaron diferencias significativas entre UC ( $94,5374 \pm 0,8913\%$ ), MC ( $97,1309 \pm 0,9893\%$ ) y UCH ( $94,4082 \pm 0,3030\%$ ) (ver Anexo 1); sin embargo, la porosidad de MCH ( $91,8624 \pm 1,0892\%$ ) fue significativamente menor (Fig. 24). Esta disminución en la porosidad puede deberse a que la disposición microestructural de los soportes MC permite incorporar HAp homogéneamente en toda la estructura interviniendo en la formación de los poros durante el congelamiento y reduciendo así la porosidad.

La relación entre la porosidad y la resistencia mecánica de los soportes es inversamente proporcional: a mayor porosidad menor es la resistencia mecánica. Por lo anterior, el desarrollo de un soporte con altas porosidades y propiedades mecánicas adecuadas continua siendo uno de los mayores desafíos en la BTE [75]. De ahí que la fabricación de soportes unidireccionales, como los producidos en este trabajo, puede representar una alternativa para la mejora de las propiedades mecánicas de soportes altamente porosos. Al mejorar las características mecánicas de soportes elaborados de Col-I o Col-I/HAp se aprovecha las características biológicas naturales de estos materiales como la disponibilidad de sitios específicos de unión para las células en el Col-I y como la biocompatibilidad de la HAp, lo que no ocurre con soportes elaborados a partir de metales, los cuales a pesar de tener propiedades mecánicas altas, su biocompatibilidad es reducida.



**Figura 24.** Box-plot de la porosidad de los soportes. ( $n=3$ );  $*p \leq 0.05$ .

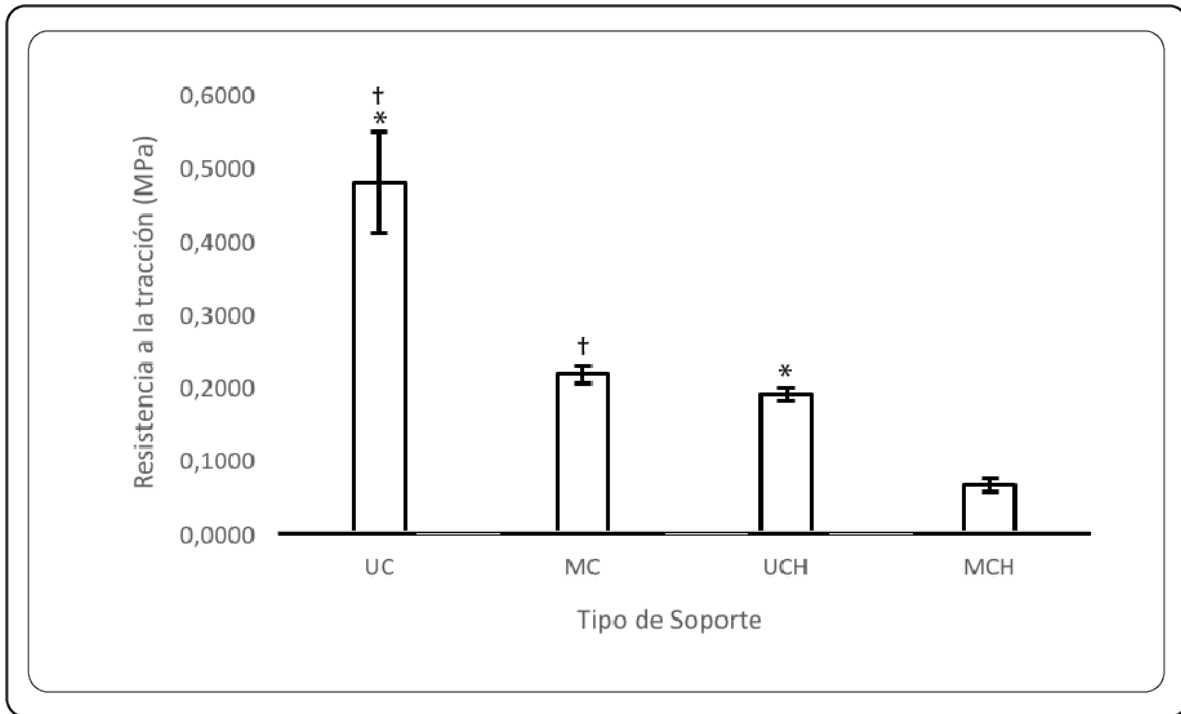
## 5.2.4 Propiedades Mecánicas

### 5.2.4.1 Resistencia a Tracción

Al comparar la influencia de la direccionalidad de los poros en la resistencia a la tensión, se observa que los soportes UC soportan 53% más fuerza ( $0,4781 \pm 0,0695$  MPa) que los MC ( $0,2172 \pm 0,0116$  MPa) (Fig. 25) (Anexo 2). Este resultado puede explicarse porque en los soportes UC la transmisión de las cargas recae principalmente sobre los poros unidireccionales formados por las fibras de colágeno en dirección axial, quienes aditivamente contrarrestan las fuerzas de tensión. Contrariamente, los poros y fibras de los soportes MC se comportan unitariamente y resisten individualmente la tensión por no estar organizados en una sola dirección; de ahí, que la probabilidad de ruptura por cargas sea mayor que en los soportes UC. Otros autores han reportado hallazgos similares al comparar soportes unidireccionales frente a soportes con porosidad aleatoria fabricados con el mismo material [125], evidenciando que la dirección axial de los poros contribuye significativamente a las propiedades mecánicas de los soportes.

La resistencia a la tracción de los soportes UCH ( $0,1893 \pm 0,0094$  MPa) y MCH ( $0,0657 \pm 0,0102$  MPa) fue menor que la de los soportes sin HAp (Fig. 25), lo cual, indica que la adición de HAp afecta negativamente su capacidad para resistir la tracción. Esto se debe a que las propiedades mecánicas de estos soportes dependen de la interacción de las fibras de Col-I con los cristales de HAp, la proporción de ambos componentes y el tamaño de las partículas de HAp [99]. Estos parámetros en su mayoría están determinados por el método de fabricación, el cual se basó en mezclar la dispersión de Col-I con HAp en polvo con un instrumento de dispersión de alto rendimiento (ULTRA-TURRAX®), así como, en el entrecruzamiento químico de la mezcla con glutaraldehído (0,02%, GTA) para favorecer el atrapamiento de la HAp en las fibras de Col-I. Los resultados descritos indican que los cristales de HAp interaccionan con el Col-I superficialmente y que las fuerzas de tracción solo son soportadas por el Col-I, el cual en proporción es menor (30%) en UCH y MCH que en los soportes UC y MC (100%). Estos resultados difieren de datos publicados [96], que indican que la resistencia a la tracción de soportes hechos con diferentes proporciones de Col-I/HAp (1:2; 1:4 y 1:6) mejora al aumentar la concentración de HAp. Esta discrepancia puede deberse a la estructura menos porosa y más compacta de los soportes

evaluados en el trabajo mencionado; también, al porcentaje de agente entrecruzante. En su caso usaron 0.3% de GTA que aunque puede contribuir sustancialmente a la resistencia mecánica, disminuye considerablemente su biocompatibilidad debido a que los remanentes de este químico son citotóxicos.



**Figura 25.** Gráfica de la resistencia a la tracción de los soportes evaluados en este estudio. Media  $\pm$  DE, ( $n=3$ ); \* comparación entre uni- vs. multidireccionalidad (UC vs. MC; UCH vs. MCH); † comparación de Col-I vs. Col-I/HAp dentro de uni- y multidireccional (UC vs. UCH; MC vs. MCH).  $p \leq 0.05$ .

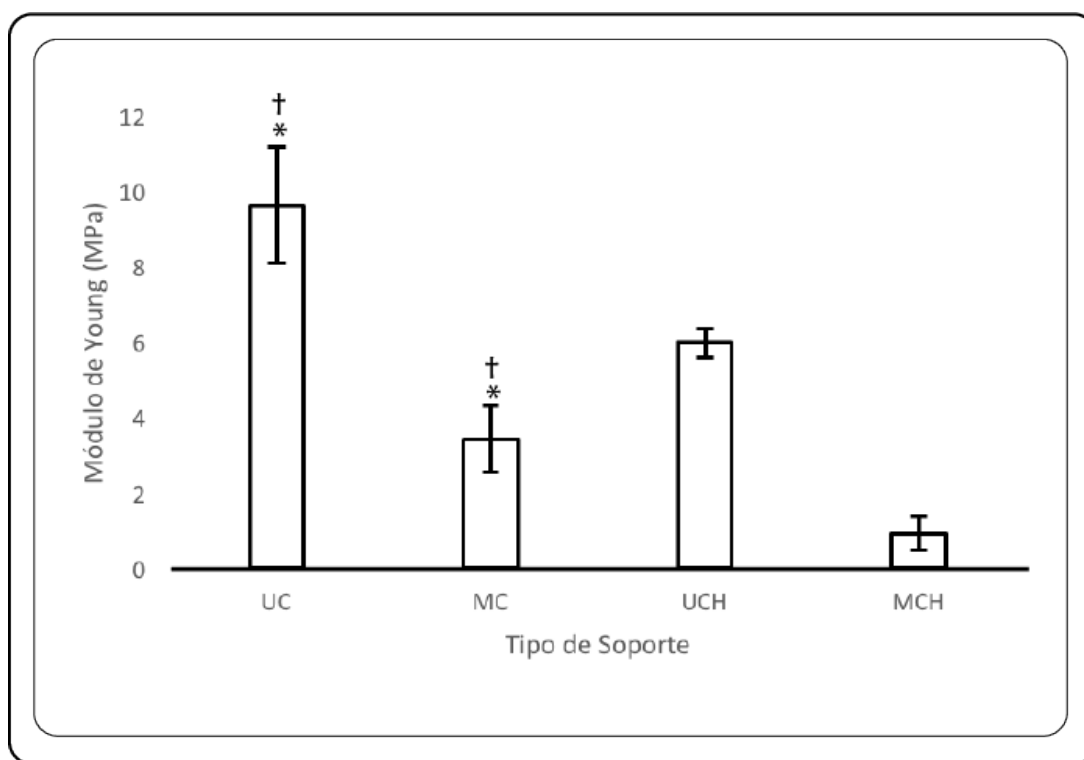
El comportamiento mecánico de soportes con microestructuras porosas está estrechamente relacionado con su porcentaje de porosidad, debido a que la resistencia mecánica disminuye a medida que aumenta la porosidad [88]. Sin embargo, a pesar de que la porosidad de los soportes MCH fue significativamente menor que la de los demás soportes (UC, MC y UCH) evaluados en esta tesis, este fue el soporte con menor resistencia a la tracción. Es posible que la diferencia en porosidad observada no haya sido suficiente para influir en las propiedades mecánicas de este soporte y que la combinación de la microestructura multidireccional y la presencia de HAp sean los responsables de su pobre desempeño mecánico. A pesar de que la incorporación de HAp en los soportes evaluados



afectó su capacidad de soportar fuerzas de tracción, la HAp por su naturaleza rígida se ha usado mayoritariamente en la producción de soportes de Col-I diseñados para huesos expuestos a cargas mecánicas altas [83].

#### 5.2.4.2 Módulo de Elasticidad

La direccionalidad y la composición afectan el módulo de elasticidad de los soportes de Col-I y Col-HAp. Los soportes UC exhibieron un módulo de elasticidad ( $9,6225 \pm 1,5460$  MPa) mayor que los soportes MC ( $3,4264 \pm 0,8827$  MPa), probablemente porque las fibras de colágeno de los poros unidireccionales funcionan como cables que contribuyen a la recuperación elástica del material sin que se alcance una fase plástica. Por otro lado, la presencia de HAp redujo la capacidad elástica de los soportes UCH ( $5,9734 \pm 0,3876$  MPa) debido a que los cristales de HAp confieren rigidez a la microestructura, disminuyendo la elasticidad con respecto a los soportes UC. Este efecto fue mayor en los soportes MCH ( $0,9272 \pm 0,4445$  MPa) (Fig. 26).



**Figura 26.** Gráfica que muestra el Módulo de Young de los diferentes tipos de soporte incluidos en este trabajo. Media  $\pm$  DE, ( $n=3$ ); \* comparación entre uni- vs. multidireccionalidad (UC vs. MC; UCH vs.

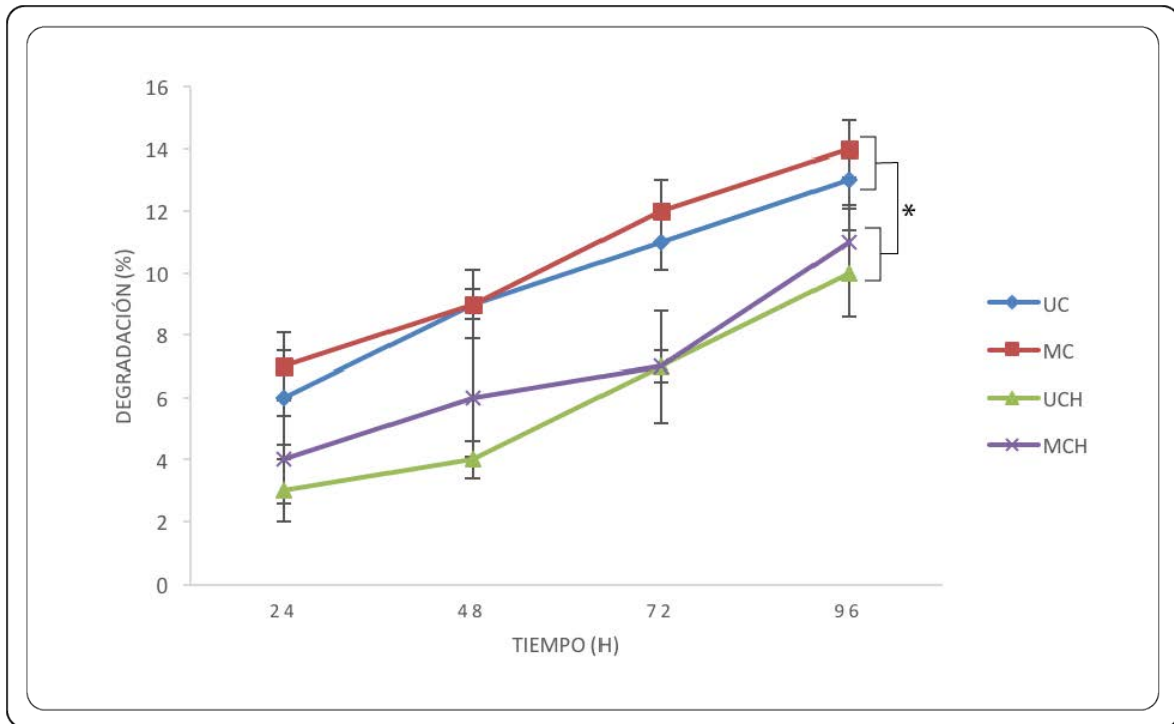
MCH); † comparación de Col-I vs. Col-I/HAp dentro de uni- y multidireccional (UC vs. UCH; MC vs. MCH).  $p \leq 0.05$ .

## 5.2.5 Propiedades Biológicas

### 5.2.5.1 Biodegradabilidad

La degradación de los soportes que se usan en TE debe coincidir con la formación de nuevo tejido con el fin de que puedan guiar la regeneración este. En el caso de la BTE, la tasa de degradación debe ser lenta y controlada debido a que la regeneración ósea tarda entre 3-6 meses [75]. En este trabajo se observó que el porcentaje de degradación después de 96h no fue mayor al 15%, sugiriendo que los soportes exhiben una degradación lenta debido principalmente al entrecruzamiento químico con GTA (0,02% %v/v). Para corroborar esto, se digirieron enzimáticamente los cuatro tipos de soportes sin entrecruzar con GTA y se observó que estos se degradaron completamente en aproximadamente 12h (UC y MC) y 18h (UCH y MCH). Lo anterior, corrobora lo encontrado por otros trabajos [126] [121] acerca de que el entrecruzamiento químico con GTA disminuye la tasa de degradación de soportes de Col-I.

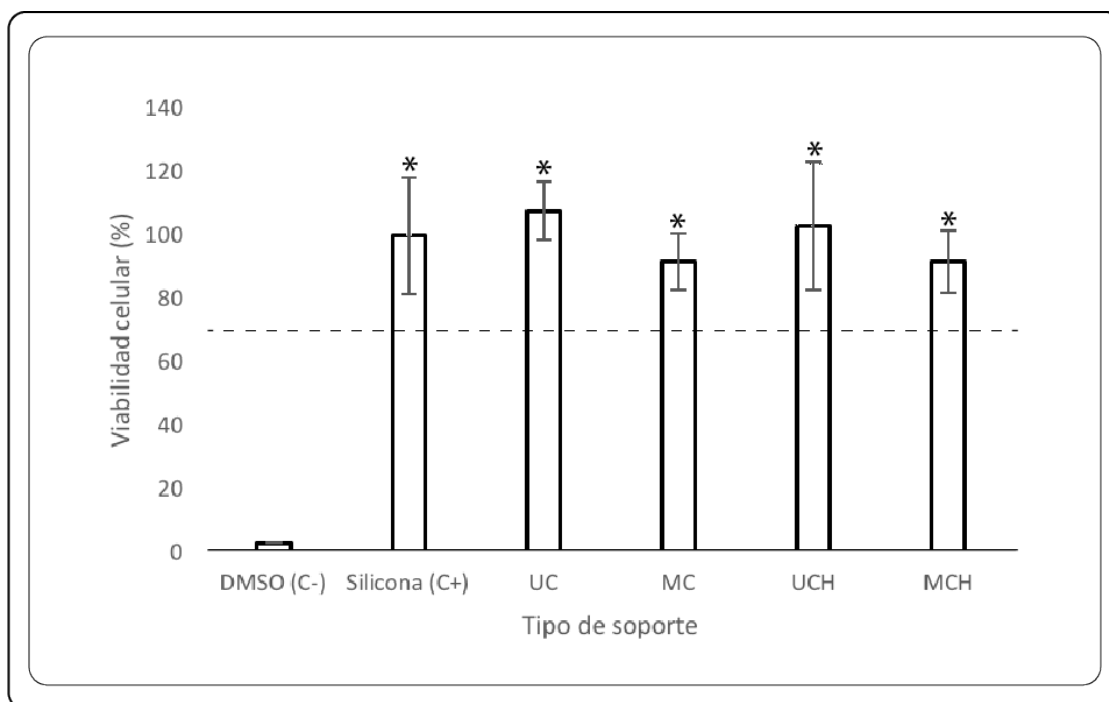
El porcentaje de degradación de los soportes con HAp fue menor que el de los soportes de Col-I (Anexo 4). Este resultado es soportado por las evaluaciones por ESEM y FESEM presentadas en este trabajo (Fig. 20; Fig. 21), que indican que la HAp disminuye el área superficial de las fibras colágenas que sirven de sustrato a la colagenasa (Fig. 28). Además, por datos publicados que muestran que el porcentaje de degradación de soportes de Col-HAp es inversamente proporcional a la cantidad de HAp presente en los soportes [97], Finalmente, la direccionalidad de los poros de los soportes no afecta significativamente su tasa de degradación (Anexo 4).



**Figura 27.** Gráfica de la dinámica de degradación. Se muestran los porcentajes de la degradación enzimática de los cuatro tipos de soporte incluidos en este trabajo ( $n=3$ ); (media  $\pm$  DE);  $*p \leq 0.05$ .

### 5.2.5.2 Reactividad Biológica

El ensayo de citotoxicidad se usó como método para evaluar la biocompatibilidad de los soportes con fibroblastos de la línea L929 (fibroblastos murinos). Ninguno de los soportes presentó actividad citotóxica, presentando viabilidades celulares de  $107 \pm 9\%$ ;  $102 \pm 20\%$ ;  $91 \pm 10\%$  y  $107 \pm 11\%$  para UC, UCH, MC y MCH, respectivamente. Los datos obtenidos sugieren que estos no inducen respuestas biológicas adversas *in vitro* [88]. Según el estándar para dispositivos médicos – ISO 10993-5, un dispositivo debe ser considerado citotóxico cuando el contacto directo de estos o extractos de cultivo expuestos a ellos reducen la viabilidad celular por debajo del 70%. La citotoxicidad es un indicativo de la biocompatibilidad de los soportes, ya que estos y sus productos de degradación no deben ser tóxicos [75].

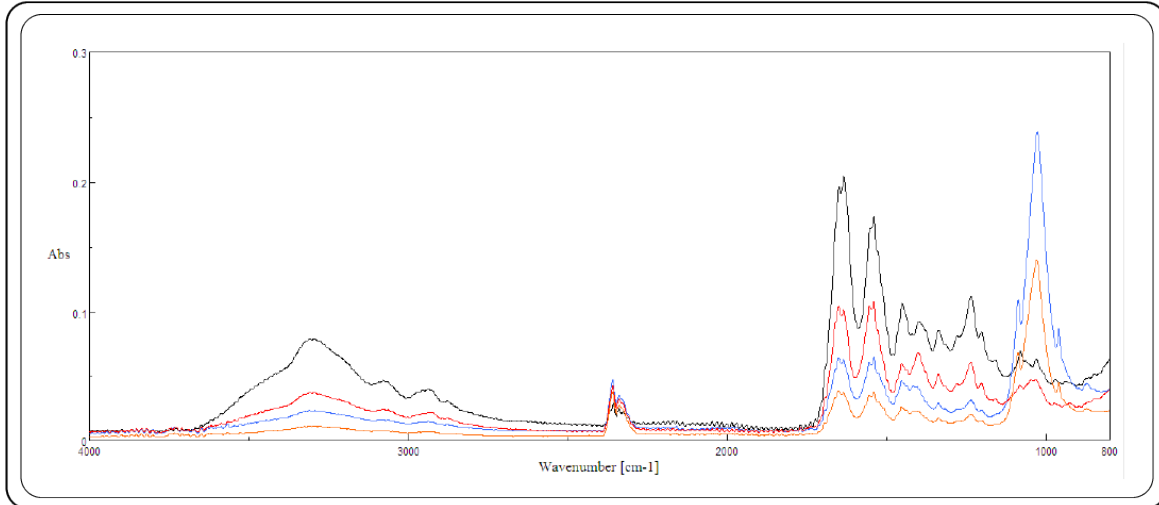


**Figura 28.** Gráfica de la evaluación de la citotoxicidad de los soportes. Se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos mediante un ensayo MTT realizado de acuerdo al estándar para dispositivos médicos – ISO 10993-5. Como control negativo de viabilidad se usó dimetil sulfóxido (DMSO) y como control positivo silicóna estéril. ( $n=3$ ); \*comparación de grupos contra C-.  $p \leq 0.05$ .

## 5.2.6 Propiedades Fisicoquímicas

### 5.2.6.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis FTIR de los soportes uni- y multidireccionales de Col-I y Col-I/HAp mostró que el proceso de fabricación no afecta su estructura química. Se identificaron las bandas características para el colágeno y la hidroxiapatita, evidenciándose los picos correspondientes a los modos de flexión y estiramiento de los enlaces del grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  en la región de  $600\text{-}1100\text{cm}^{-1}$  (Fig. 30 – líneas azul y naranja) y las bandas típicas del colágeno I, correspondientes a las amidas ubicadas en  $1648\text{cm}^{-1}$  (amida I, estiramiento de  $\text{C}=\text{O}$ ),  $1548\text{cm}^{-1}$  (amida II, deformación de  $\text{N-H}$ ) y  $1239\text{cm}^{-1}$  (amida III, deformación de  $\text{N-H}$ ) (Fig. 30 - líneas roja y negra) [127].

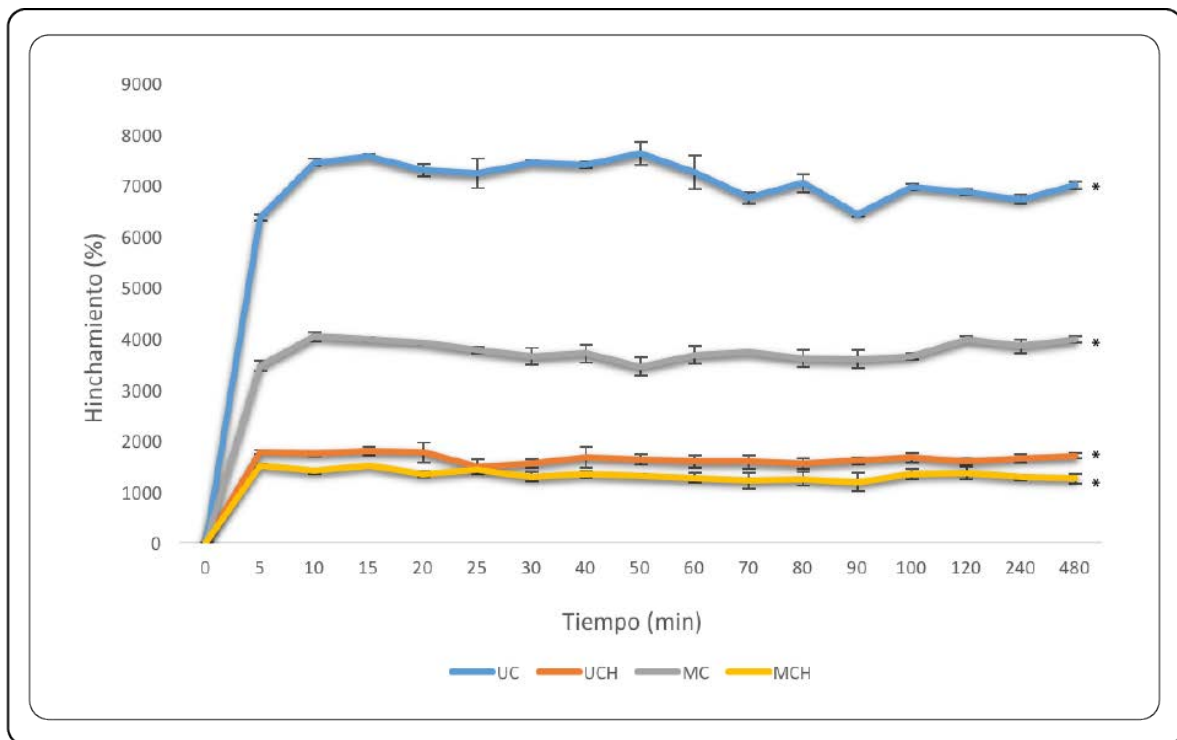


**Figura 29.** Gráfica de espectros de FTIR. La figura muestra los espectros de cada uno de los soportes analizados. UC (—); MC (—); UCH (—); MCH (—).

### 5.2.6.2 Capacidad de Absorción de Agua

El porcentaje de hinchamiento de los soportes muestra que la incorporación de HAp en los soportes disminuye significativamente la capacidad de absorción. Aunque hubo diferencias significativas entre UCH y MCH (Anexo 3) la tendencia de hinchamiento es muy similar, lo cual es de esperar debido a que poseen tamaños de poro y porosidades similares. En los soportes sin HAp (UC y MC) se encontraron porcentajes de hinchamiento cercanos a 7000% y 4000%, respectivamente. Esta diferencia se explica porque los poros paralelos de UC son capaces de albergar mayor cantidad de moléculas de agua que los poros multidireccionales de MC. La diferencia observada en la capacidad de absorción de agua de los soportes de Col-I (UC y MC) y los soportes de Col-I/HAp (UCH y MCH) se debe principalmente a que la HAp, por ser hidrofóbica, evita la incorporación de sustancias polares dentro de la microestructura. A pesar de esto, el porcentaje de hinchamiento para estos soportes fue cercano al 1500%. La dinámica de hinchamiento de estos soportes es comparable a lo reportado por [96], en el que el equilibrio (estado en el cual los soportes no pueden incorporar más moléculas de agua) se alcanza en los primeros 10min (Fig. 27), evidenciando la alta capacidad de estas estructuras de incorporar líquido actuando como esponjas. A pesar de la similitud en las dinámicas de hinchamiento, las magnitudes difieren en un orden de magnitud entre lo reportado por [96] y los resultados de este estudio, los cuales son mayores, alcanzando un 4000% de hinchamiento en el caso de MC, el soporte

microestructuralmente más similar el desarrollado por ellos, en el que reportan un porcentaje de hinchamiento cercano al 200%, evidenciando la importancia de la porosidad en este tipo de propiedades. La capacidad de hinchamiento de soportes para TE es de suma importancia ya que esta propiedad permite la absorción de líquidos corporales y la transferencia de nutrientes celulares y metabolitos dentro del soporte. Además, el hinchamiento de la microestructura incrementa el tamaño del poro y la porosidad total, maximizando el área superficial interna del soporte, influyendo en la infiltración y adhesión celular. En condiciones fisiológicas el hinchamiento debe ser controlado ya que de otra manera puede causar un debilitamiento de la estructura y la rápida degradación de este [128].



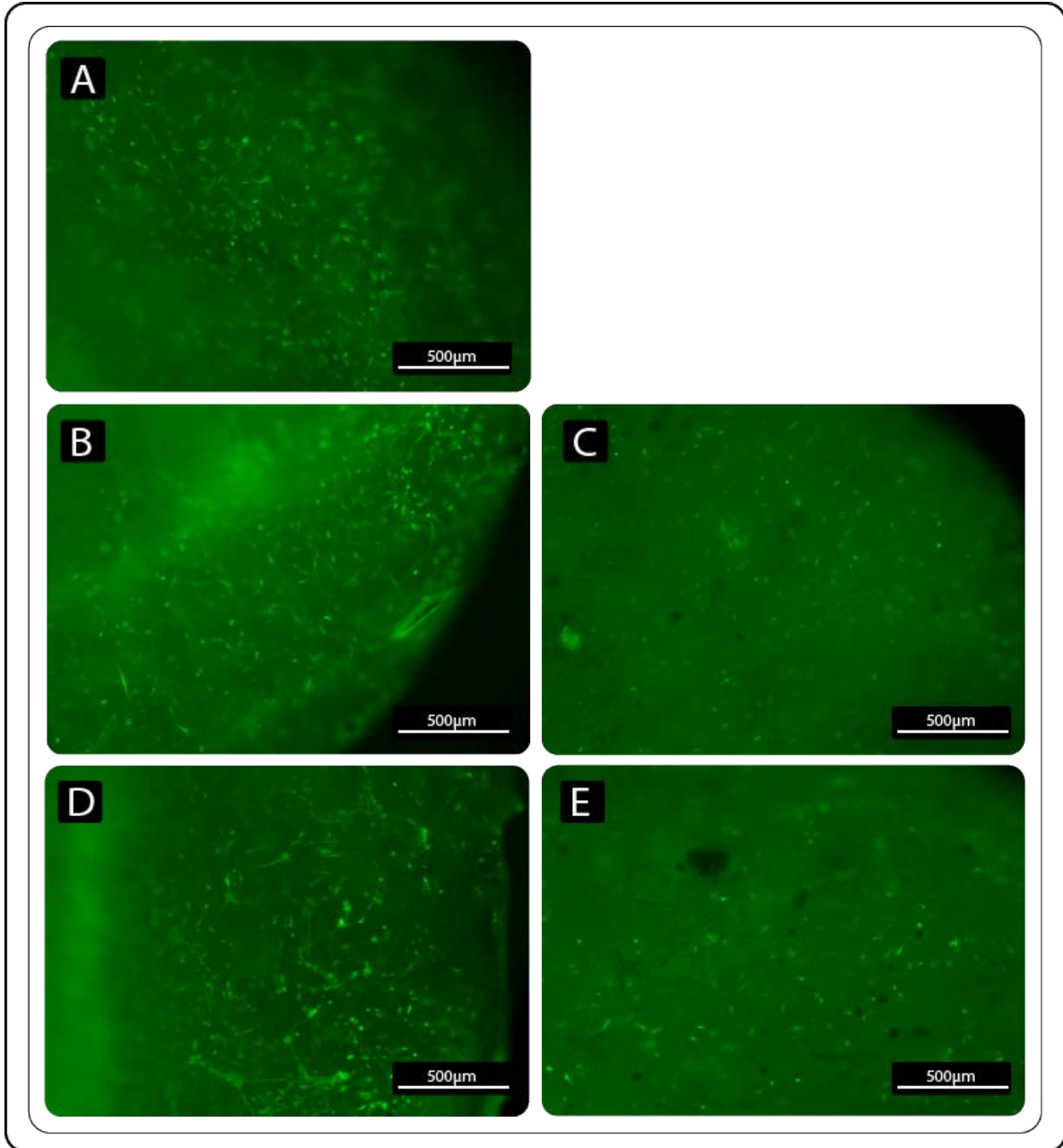
**Figura 30.** Gráfica de la capacidad de hinchamiento de los soportes. Se muestran los porcentajes de hinchamiento de los soportes incluidos en este trabajo. ( $n=3$ ); (media  $\pm$  DE); \*  $p \leq 0.05$ .

## 5.3 Resultados y Discusión Objetivo 3

### 5.3.1 Ensayos *in vitro* con rBM-MSC

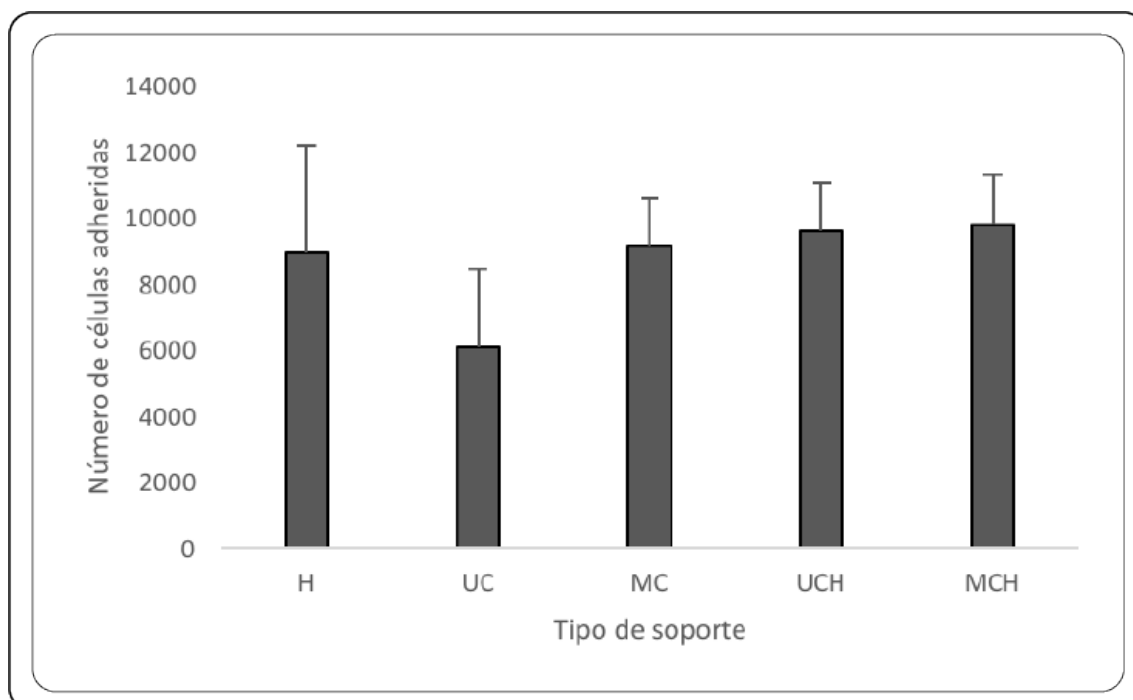
#### 5.3.1.1 Adhesión y Proliferación de rBM-MSC a los Soportes

Se evaluó la capacidad de las rBM-MSCs de migrar y distribuirse en los diferentes tipos de soportes desarrollados, incluyendo un producto comercial (Helistat®) como control. Las células se adhirieron y distribuyeron en todos los soportes, inclusive en la región central de estos (Fig. 31). Sin embargo, aparentemente hubo diferencias en densidad celular siendo esta mayor en los soportes sin HAp ( UC y MC) que en los soportes con HAp (UCH y MCH) (Fig. 31B-E). Para corroborar lo encontrado en las observaciones de las células marcadas con *Cell Tracker Green*, se cuantificó el número de células adheridas a los soportes 24h, por el método de MTT, después de que fueron sembradas; tiempo que fue considerado como día 0. La Fig. 32 muestra los datos del número de células adheridas a cada soporte. El análisis estadístico de los datos indicó que no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes cultivos (ver Anexo 6).



**Figura 31.** Imágenes de estereoscopia de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas de cultivos de rBM-MSCs marcados con *Cell Tracker Green*. Helistat® (A); UC (B); UCH (C); MC (D) y MCH (E). Magnificación 8X.

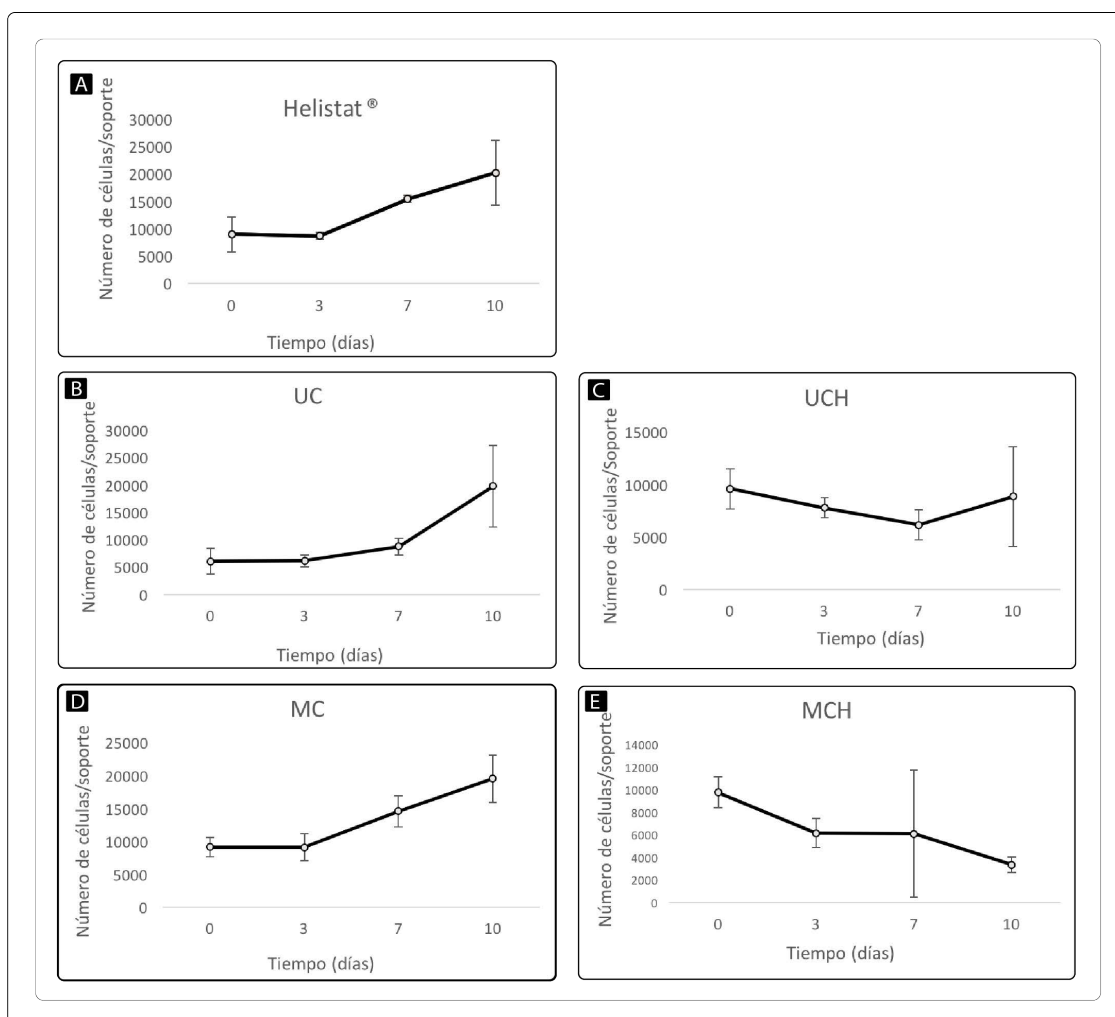




**Figura 32.** Gráfica de la cuantificación de las rBM-MSCs presentes en cada uno de los soportes. Se muestran los resultados de un ensayo de MTT llevado a cabo 24h después de la siembra. \*Diferencias significativas:  $p \leq 0.05$ .

Una vez se comprobó la adhesión de las células a los soportes transcurridas 24h de la siembra (día 0), se hicieron curvas de crecimiento con el fin de evaluar la proliferación celular durante 10 días (Fig. 33). Las curvas de crecimiento de los cultivos hechos en los soportes de Col-I sin HAp indican que durante el tiempo del ensayo las células crecieron exponencialmente, alcanzando en todos los casos una densidad poblacional igual o mayor a las 20.000 células por soporte. En los cultivos hechos con Helistat® las células empezaron a proliferar desde el día 3 y la población obtenida al final del ensayo fue de  $20197 \pm 5960$ , duplicando las 10000 células sembradas en el primer día (Fig. 33A). En los soportes UC las células también proliferaron a partir del día 3, aunque más lentamente que las células sembradas en Helistat®, y la densidad poblacional alcanzada en el día 10 fue de  $19748 \pm 7391$  (Fig. 33 B). La densidad poblacional en MC fue de  $19523 \pm 3549$  (Fig. 33D). Las curvas de crecimiento de las células sembradas en los soportes con HAp (UCH y MCH) mostraron disminución de la densidad poblacional en función del tiempo. Como los resultados del ensayo de citotoxicidad realizado siguiendo las indicaciones de la norma ISO 10993-5 indican, los soportes no fueron citotóxicos; por lo tanto, este fenómeno puede

deberse a que la HAp al recubrir las fibras de los soportes no favorece la adhesión celular y en consecuencia las células mueren. Otros autores han encontrado que la proliferación y diferenciación ósea de rMSC es mayor en soportes de ácido poli-L-láctico (PLLA) con nanopartículas de HAp (nano-HAp) que en los soportes del mismo material con micropartículas de HAp (micro-HAp), debido a que el área superficial de los soportes con nanoHAp es mayor que en los soportes con micro-HAp [129]. En esta tesis, en los soportes UCH y MCH se formaron microaglomerados de HAp en la superficie de estos soportes y en las paredes de algunos poros (ver Figs. 21C y D). En consecuencia, el área superficial de la microestructura disminuyó afectando la adhesión de las células.

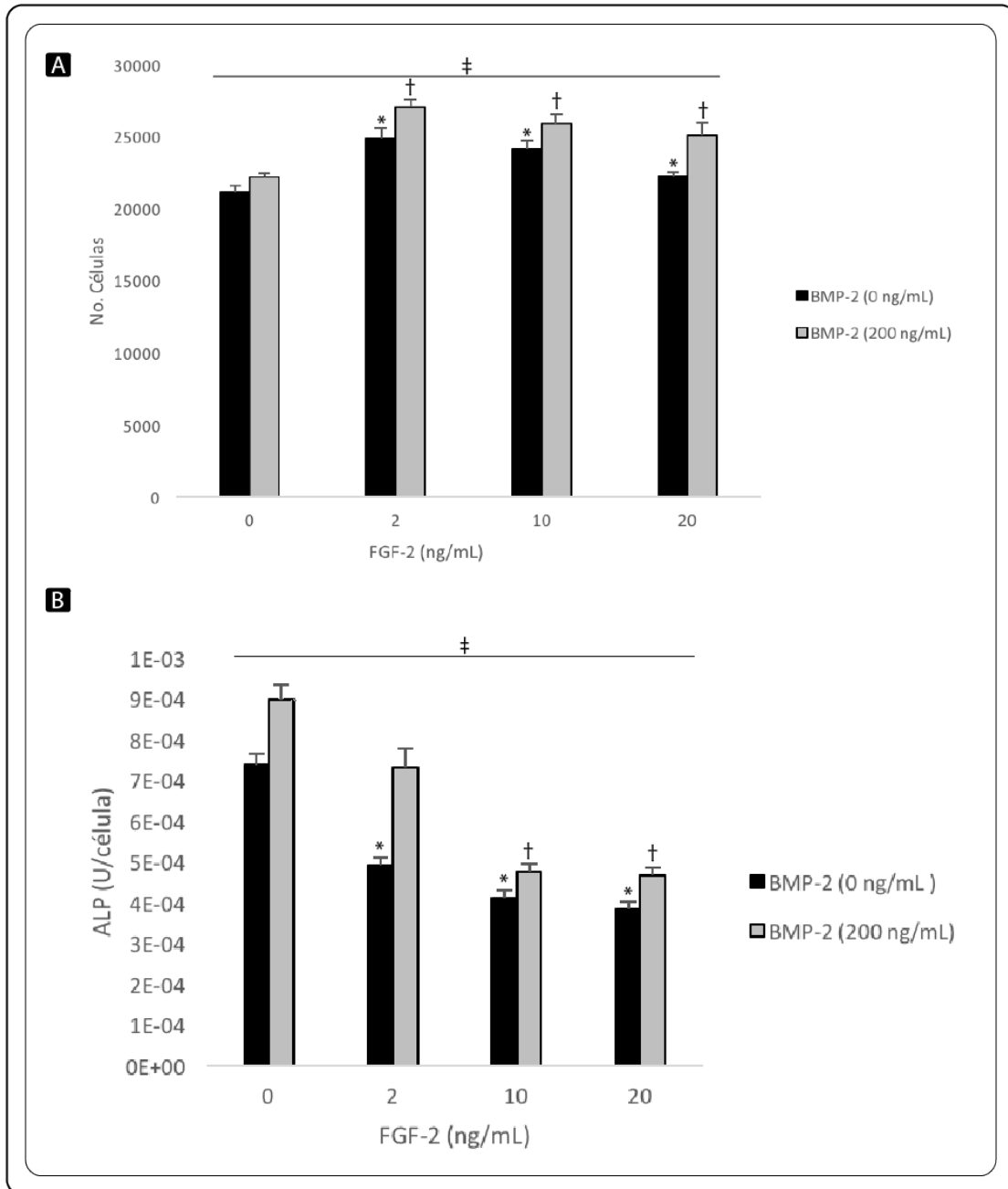


**Figura 33.** Gráficas de proliferación celular. Las gráficas presentan los datos de proliferación de las rBM-MSCs sembradas en los soportes. Helistat® (A); UC (B), UCH (C); MC (D); MCH (E). (media  $\pm$  DE).

### 5.3.1.2 Evaluación del Efecto de las Citoquinas FGF-2 y BMP-2 en la Diferenciación de rBM-MSC en Monocapa

Para determinar la concentración del *factor de crecimiento fibroblástico-2* (FGF-2) y de la *proteína morfogénica ósea-2* (BMP-2) a emplear en las evaluaciones de proliferación y diferenciación de células rBM-MSCs sembradas en los soportes, primero se hizo una evaluación del efecto de estos factores en cultivos en monocapa confluentes de estas células. Los datos de la determinación de la proliferación celular con el método de XTT (Fig. 34A) mostraron que la adición de FGF-2 (2, 10 y 20 ng/mL) o de FGF-2 (2, 10 y 20 ng/mL) con BMP-2 (200 ng/mL) aumenta significativamente la proliferación celular con respecto a sus respectivos controles ( $p < 0.05$ ). Estos datos coinciden con otros trabajos que muestran que FGF-2 es un regulador de la proliferación y diferenciación de MSCs [130][131]. Debe resaltarse que las diferencias de la comparación entre FGF-2 y su control sin FGF-2 y de FGF-2/BMP-2 vs. BMP-2 fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (ver Anexo 7). Los hallazgos de esta tesis indican que FGF-2 y FGF-2/BMP-2 juegan un papel en la proliferación de rBM-MSCs y que el mayor efecto se observa al usar concentraciones de FGF-2 en el rango de 2 a 10 ng/mL. Lo mencionado concuerda con datos publicados que demuestran que en cultivos de MSC el mayor efecto mitogénico de FGF-2 se encuentra en el rango de 1-10 ng/mL [132]. El papel de BMP-2 en la proliferación de MSC por medio de la ruta de señalización MAPK/Erk también ha sido descrito anteriormente [133]; también, el efecto sinérgico de FGF-2 y BMP-2 en la proliferación y diferenciación de MSCs [134].

En este trabajo también se evaluó el efecto de FGF-2 y BMP-2 en la diferenciación osteogénica de las rBM-MSC, estimada a través de la cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) en los cultivos y expresada como actividad específica (Fig. 34B). Los datos mostraron que al aumentar la concentración de FGF-2 la expresión de ALP disminuyó, lo cual indica que este factor es un regulador negativo de la diferenciación. Por otro lado, en ausencia de FGF-2 y presencia de BMP-2 (200 ng/mL) la expresión de ALP fue mayor que en ausencia de factores (control). Adicionalmente, la adición de FGF-2 (2, 10 y 20 ng/mL) manteniendo constante la concentración de BMP-2 disminuyó la expresión de ALP. En conjunto estos resultados indican que FGF-2 antagoniza el efecto osteogénico de BMP en rBM-MSC.

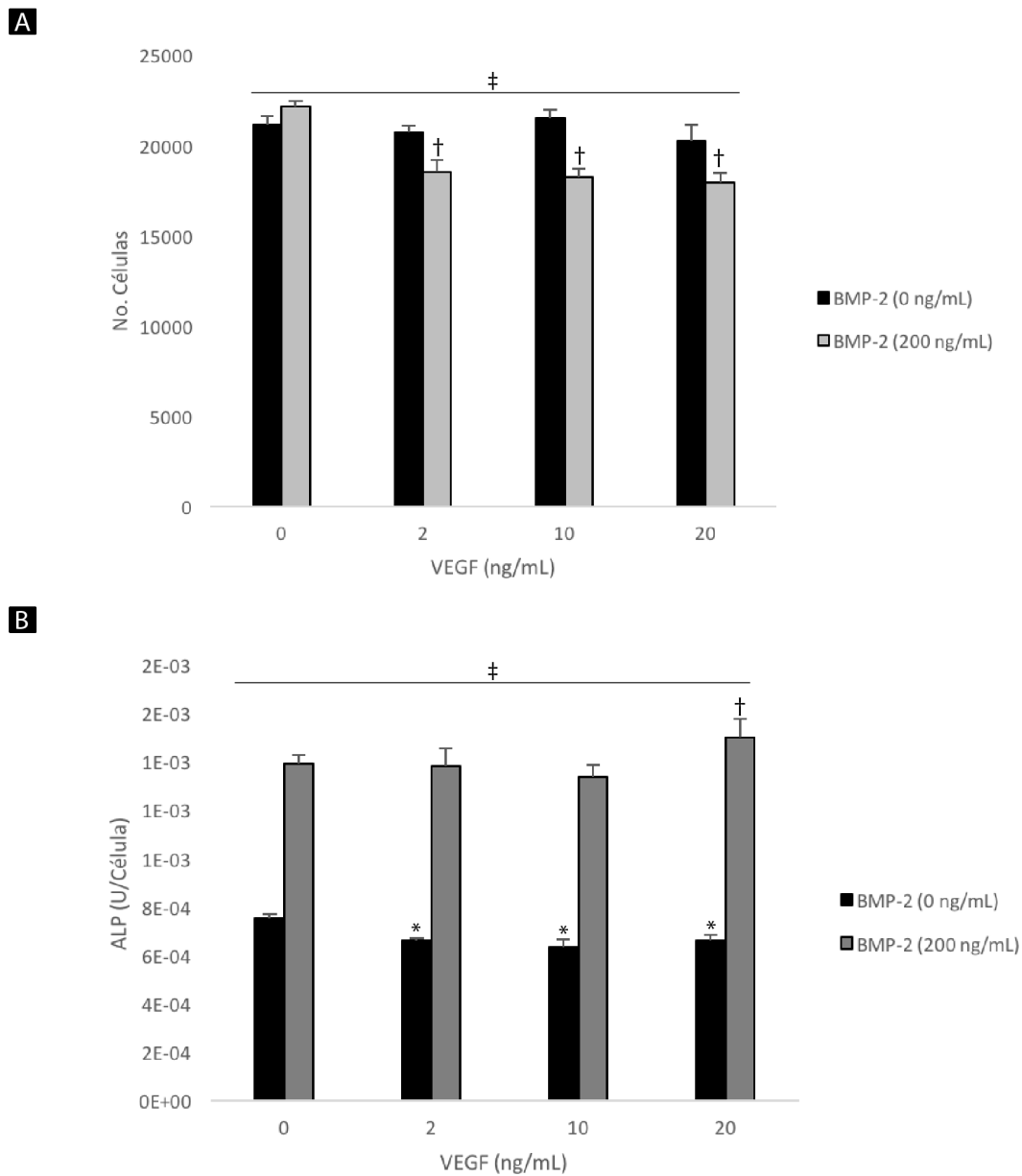


**Figura 34.** Gráfica de la evaluación del efecto de FGF-2 y BMP-2 en las rBM-MSCs. Se evaluaron cultivos de rBM-MSCs de 10 días. Cuantificación del número de células (A); actividad ALP (B). \*: diferencias significativas en la comparación del efecto de la adición de diferentes concentraciones de FGF-2 (0, 2, 10, 20 ng/mL); †: diferencias significativas en la comparación del efecto de las diferentes concentraciones de FGF-2 (0, 2, 10, 20 ng/mL) y BMP-2 (200 ng/mL); ‡: diferencias significativas en la comparación de FGF-2 (0, 2, 10, 20 ng/mL) vs. FGF-2 (0, 2, 10, 20 ng/mL) más BMP-2(200 ng/mL).  $p \leq 0.05$ .

### 5.3.1.3 Evaluación del Efecto de las Citoquinas VEGF y BMP-2 en la Diferenciación de rBM-MSC en Monocapa

El *factor de crecimiento endotelial vascular* (VEGF) es reconocido por inducir angiogénesis y proliferación de BM-MSCs *in vitro* [135]. En este trabajo la adición de VEGF (2, 10 y 20 ng/mL) no afectó el número celular de las rBM-MSCs con respecto al control sin VEGF. La adición de BMP-2 en ausencia de VEGF aumentó la proliferación celular mientras que en presencia de las diferentes concentraciones de VEGF la disminuyó (Fig. 35A). Lo cual sugiere un efecto antagonista de estos dos factores en el crecimiento de los cultivos de rBM-MSCs.

Los datos de la evaluación de la diferenciación mostraron que las diferentes concentraciones de VEGF (2, 10 y 20 ng/mL) disminuyen la expresión de ALP con respecto al control sin VEGF. También, que BMP-2 en ausencia y presencia de VEGF aumenta la expresión de este marcador (Fig. 35B) (ver Anexo 8). Cabe resaltar que a pesar de que en presencia de 20 ng/mL de VEGF la expresión de ALP disminuye, al adicionar 20 ng/mL de VEGF y 200 ng/mL de BMP-2 la expresión de este marcador aumenta con respecto al control, sugiriendo que en esas dos concentraciones estas proteínas tienen un efecto sinérgico en estimular la diferenciación osteogénica. Otros autores también han encontrado que la combinación de VEGF con factores inductores de osteogénesis como BMP-2, resulta en el aumento en las tasas de diferenciación *in vitro* [136] y en la producción de hueso *in vivo* [137].



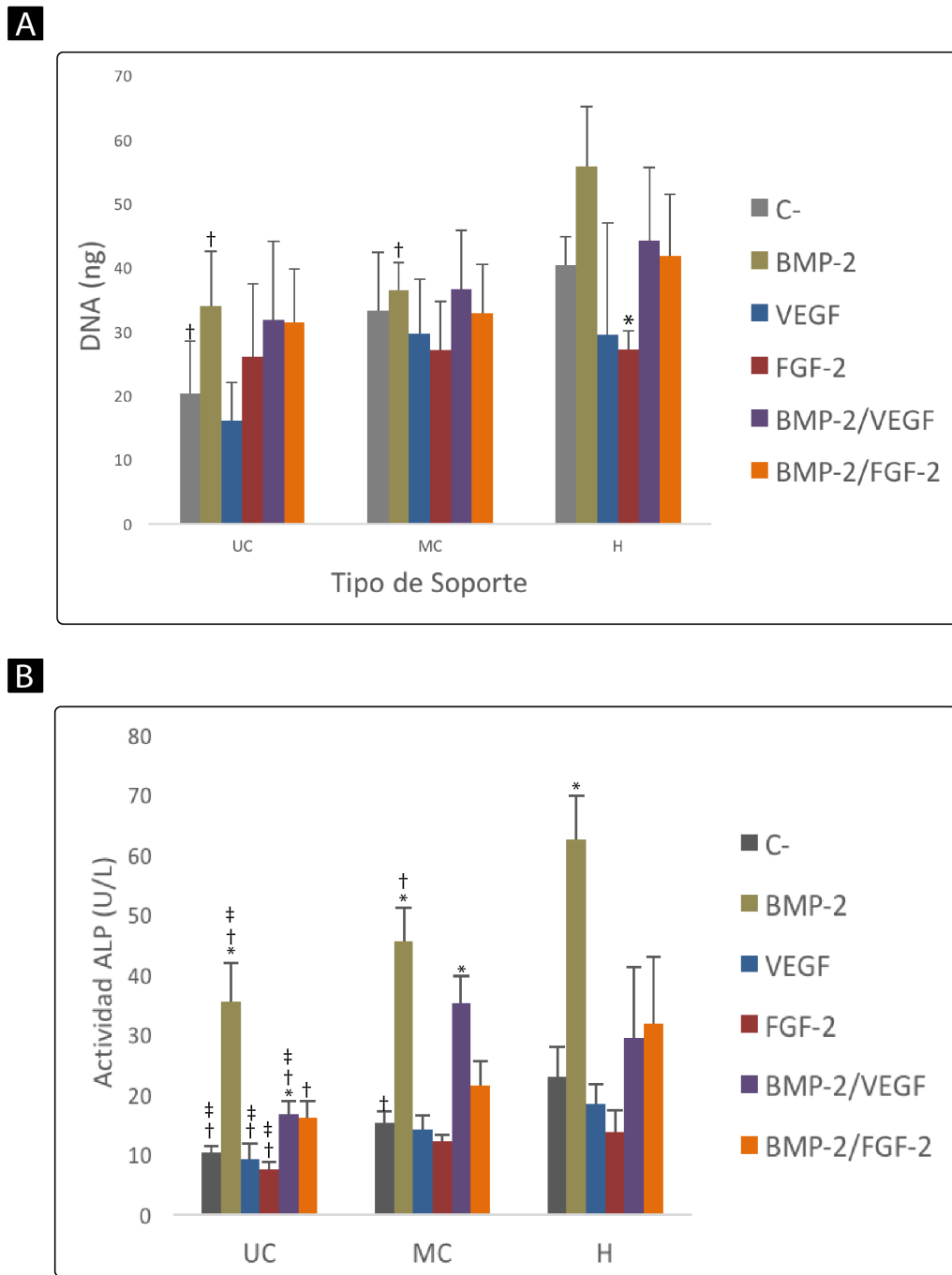
**Figura 35.** Gráfica de la evaluación del efecto de VEGF y BMP-2 en las células rBM-MSC. Se evaluaron cultivos de rBM-MSCs de 10 días. Cuantificación del número de células (A); actividad ALP normalizada (B). \*: diferencias significativas en la comparación del efecto de la adición de diferentes concentraciones de VEGF (0, 2, 10, 20 ng/mL); †: diferencias significativas en la comparación del efecto de las diferentes concentraciones de VEGF (0, 2, 10, 20 ng/mL) y BMP-2 (200 ng/mL); ‡: diferencias significativas en la comparación de VEGF (0, 2, 10, 20 ng/mL) vs. VEGF (0, 2, 10, 20 ng/mL) más BMP-2(0 ng/mL).  $p \leq 0.05$ .

### 5.3.1.4 Diferenciación de rBM-MSC Sembradas en los Soportes

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la sección anterior se seleccionaron las concentraciones de 10 ng/mL de FGF-2 y 20 ng/mL de VEGF junto con sus combinaciones con BMP-2 a 200 ng/mL para evaluar su efecto en rBM-MSCs cultivadas durante 10 días (Fig. 36). A partir de esta sección, se continuó los ensayos solamente con los soportes de Col-I (UC y MC), debido a que las rBM-MSC usadas en el estudio no proliferaron en soportes de Col-I/HAp (UCH y MCH) (ver Fig. 33C y D). El número celular fue evaluado en función de la cantidad de DNA aislado de los cultivos basados en los soportes sembrados con rBM-MSCs. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de DNA obtenido de los tratamientos y el cultivo sin factores (control). En los cultivos celulares hechos con H, FGF-2 fue el único tratamiento que disminuyó significativamente con respecto al control ( $p < 0.05$ ). (Fig. 36A) (ver Anexo 9). La comparación de los cultivos hechos con UC y con H mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los controles (C-) y entre los tratamientos con BMP-2. Por otro lado, la comparación MC vs. H solo mostró diferencias significativas en el tratamiento con BMP-2 (Fig. 36A). Lo anterior sugiere que la citoquina BMP-2 podría tener un efecto sobre la proliferación de las rBM-MSC dependiente del soporte en el que se siembran, lo cual, puede relacionarse con la capacidad de asociación del factor con cada soporte, presentando dinámicas de liberación diferentes según su microestructura. En otras palabras, las interacción de BMP-2 con las células podría estar mediada por la microestructura de los soportes que presentan el factor de forma diferencial a las células. Los resultados de la evaluación de la capacidad de absorción de agua de UC ( $7000 \pm 90\%$ ) y MC ( $4000 \pm 60\%$ ) (ver Fig. 27), refuerzan esta hipótesis. En los soportes UC el DNA de C- ( $20 \pm 8\mu\text{g}$ ) fue significativamente menor que el DNA de C- ( $33 \pm 9\mu\text{g}$ ) de los soportes MC ( $p < 0.05$ ). Este dato indica que en ausencia de factores, MC tiene más células que UC. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de DNA de UC+BMP-2 ( $34 \pm 9\mu\text{g}$ ) y MC+BMP-2 ( $36 \pm 4\mu\text{g}$ ) (Anexo 9), probablemente por el estímulo del BMP-2 en el contexto del soporte.

La Figura 36B muestra la actividad ALP total para rBM-MSCs sembradas en UC, MC y H. Dentro de cada uno de los grupos la adición de BMP-2 afectó positivamente la cantidad de ALP detectada, indicando su papel en la diferenciación osteogénica. Del mismo modo, hubo diferencias significativas en la expresión de ALP entre UC y MC en presencia de BMP-2/VEGF vs. C- (Fig. 36B) ( $p < 0.05$ ) (Anexo 10). Lo anterior, sugiere que la combinación de estas citoquinas estimula la diferenciación osteogénica de las rBM-MSC sembradas en cada soporte. Debe resaltarse que la expresión de ALP en los cultivos MC tratados con BMP-2/VEGF fue de  $35 \pm 4,6$ U/L mientras que en los cultivos UC con el mismo tratamiento fue de  $17 \pm 2,1$ U/L. Debido a que el número de células en estos dos grupos no fue significativamente diferente (ver Figura 36A), este hecho sugiere que el efecto sinérgico de BMP-2/VEGF es mayor en microestructuras multidireccionales que en microestructuras unidireccionales. La comparación de los datos de UC y MC con H también mostró diferencias significativas en presencia de BMP-2 (Fig. 36B) ( $p < 0.05$ ) (Anexo 10), que pueden deberse a que el número celular fue mayor en H. Este soporte comercial tiene una microestructura multidireccional similar a la de los soportes MC, por eso la influencia de estos dos soportes en las células puede ser similar; lo cual, no ocurre con UC debido a la unidireccionalidad de sus poros. Los datos descritos sugieren que la direccionalidad de las fibras influye en la interacción células-citoquinas *in vitro*. En la comparación entre UC y MC se encontraron diferencias significativas en todos los factores (Fig. 36B) ( $p < 0.05$ ) (Anexo 10), a excepción de la combinación BMP-2/FGF-2. Este hallazgo puede deberse a que la interconexión de los poros en MC facilita la exposición de las células a los factores. Los soportes UC por tener canales unidireccionales con fibras fuertemente empaquetadas podrían obstaculizar la difusión de los factores de un canal al siguiente, direccionando la forma en que estos son presentados a las células (Fig. 21), a pesar de que el tamaño de poro y la porosidad no son significativamente diferentes entre los soportes MC y UC (Figs. 23 y 24).





**Figura 36.** Gráfica de la evaluación del efecto de diferentes factores de crecimiento en células rBM-MSC sembradas en los diferentes soportes. Cuantificación de DNA (A) y actividad ALP total (B) de rBM-MSCs sembradas en UC, UCH, MC, MCH y H® por 10 días. \*: comparación de los tratamientos de cada grupo con sus respectivos C-; †: comparación de los grupos con H (Helistat®); ‡: comparación de UC y MC.  $p \leq 0.05$ .

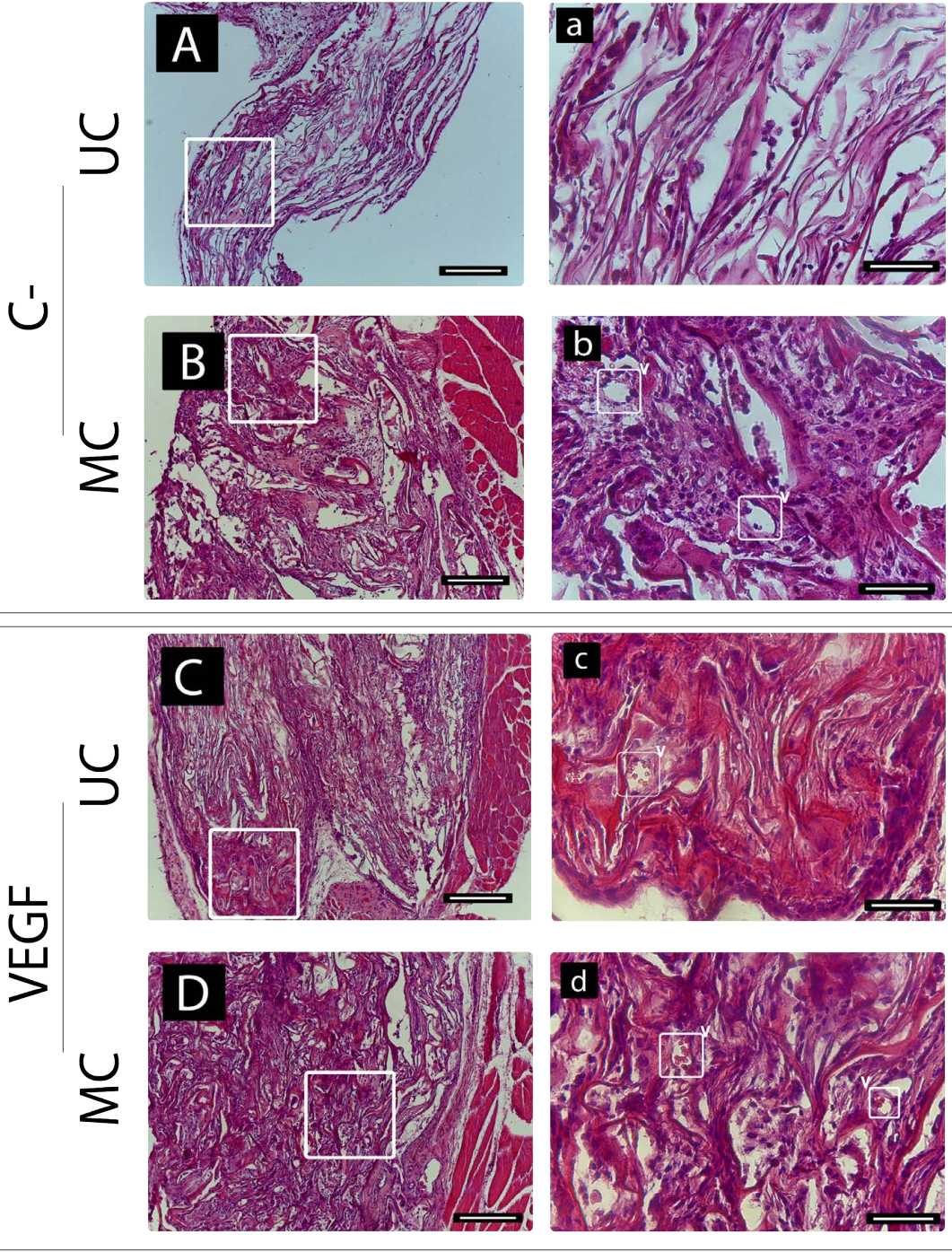
## 5.4 Resultados y Discusión Objetivo 4

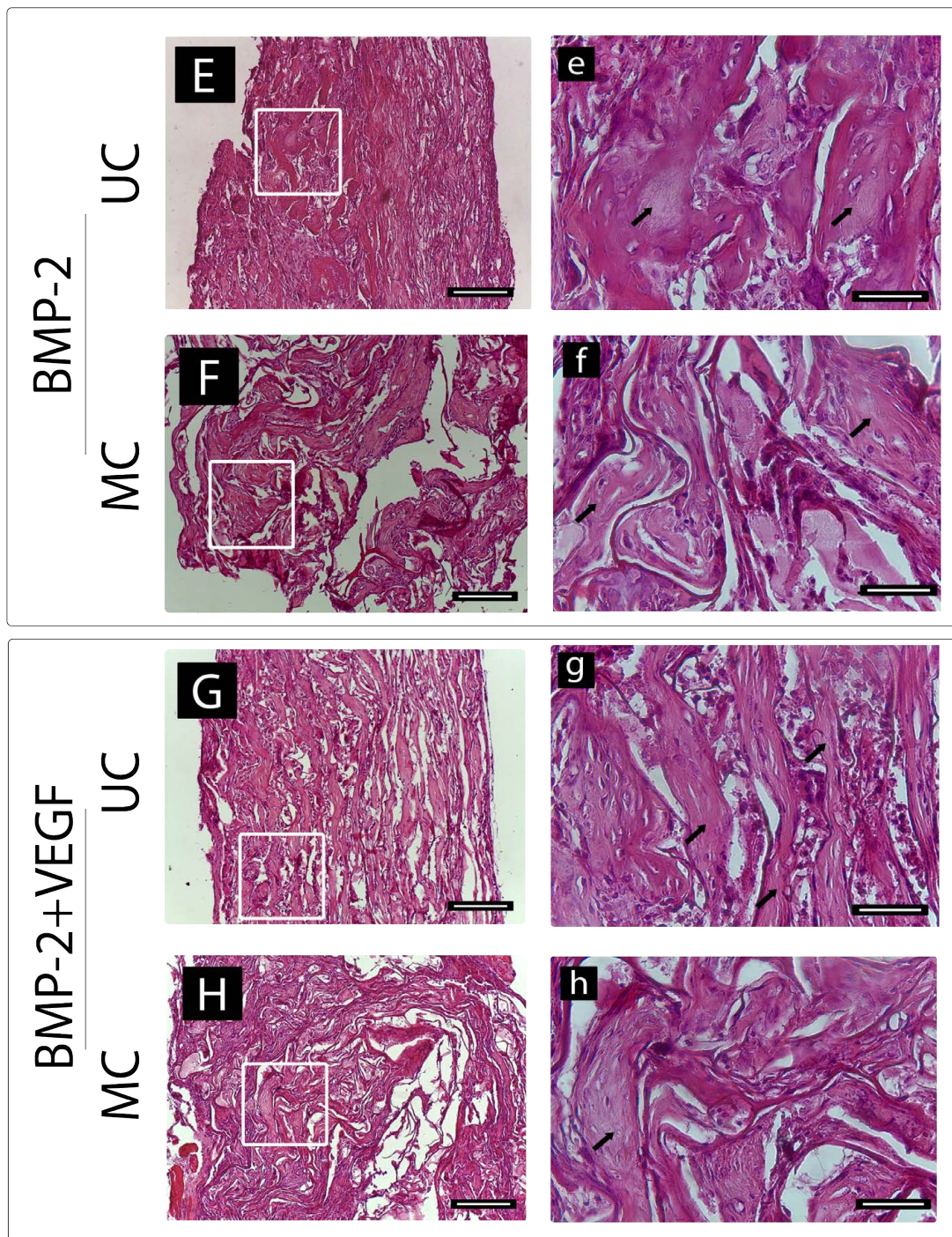
### 5.4.1 Modelo de Implantación Intramuscular Ectópica en Ratas Wistar

#### 5.4.1.1 Procesamiento Histológico: H&E

Como se describió en “Metodología”, para la evaluación histológica de la osificación *in vivo* se implantaron cuatro soportes en cada rata. Los soportes y factores a usar en el modelo *in vivo* fueron seleccionados a partir de los resultados de proliferación y diferenciación de las rBM-MSM *in vitro*. A partir de estos se seleccionaron los soportes UC y MC, y los factores BMP-2 y VEGF. Los grupos se nombraron de la siguiente forma para su descripción: UC/C-; UC/VEGF; UC/BMP-2; UC/BMP-2+VEGF y MC/C-; MC/VEGF; MC/BMP-2; MC/BMP-2+VEGF. Las secciones histológicas teñidas con H&E se usaron para evaluar el grado de infiltración celular en los soportes, la presencia de vasos sanguíneos, señales de respuesta inmune, morfología celular y características de la matriz extracelular, con el fin de identificar osificación en los implantes después de 21 días (Fig. 37). Se observó infiltración celular en 3 implantes UC/C- y en 4 implantes MC/C-. Sin embargo, no se detectaron signos de osificación. En los últimos se observan vasos sanguíneos. En los soportes UC/VEGF y MC/VEGF se detectó infiltración en 3 y 4 implantes, respectivamente. La adición de VEGF pudo estimular la quimiotaxis de las células hacia los soportes ya que se observan patrones de infiltración más complejos que los vistos en los implantes de los soportes C-. También, debido al efecto angiogénico del factor VEGF se observa un mayor número de células y la presencia de vasos sanguíneos. La presencia de células aparentemente fue mayor en MC, lo que sugiere que la microestructura de este tipo de soportes favorece en mayor medida la migración y adhesión celular. En las zonas implantadas con UC/BMP-2 se identificó fácilmente hueso en 2 implantes, con zonas de hueso y cartílago que transcurren paralelamente dentro de los canales unidireccionales, mientras que en los 2 restantes se evidenció la presencia de algunas trabéculas; sin embargo, estaban aisladas y no se encontraron indicios de médula ósea acompañante. Tres de los implantes de MC/BMP-2 osificaron con algunas zonas de transición cartílago-hueso, mientras que en el cuarto no se observó infiltración celular. En términos generales la adición de BMP-2 indujo osificación en los implantes, sin embargo,

no se detectó una influencia clara de la direccionalidad de la microestructura sobre el tipo y la cantidad de hueso producido. Los resultados más contundentes se obtuvieron con los implantes UC/BMP-2+VEGF, ya que en tres de ellos se formó hueso en 3 implantes, el último de estos implantes no se pudo recuperar en la extracción del animal. En dos de los implantes MC se detectó hueso, sin embargo, la cantidad de hueso fue baja y se limitó a las zonas marginales del implante. En los dos implantes restantes se observó un alto grado de infiltración sin la formación de matriz ósea. En general se puede decir que la combinación de BMP-2+VEGF indujo el proceso de osteogénesis en UC, las trabéculas se formaron siguiendo la orientación del eje longitudinal del implante, encarriladas entre paquetes de fibras de Col-I. En algunas zonas de los implantes la densidad de osteocitos fue alta, sin embargo, no se observaron zonas de médula ósea, asemejándose en cuanto a estructura, al hueso cortical.

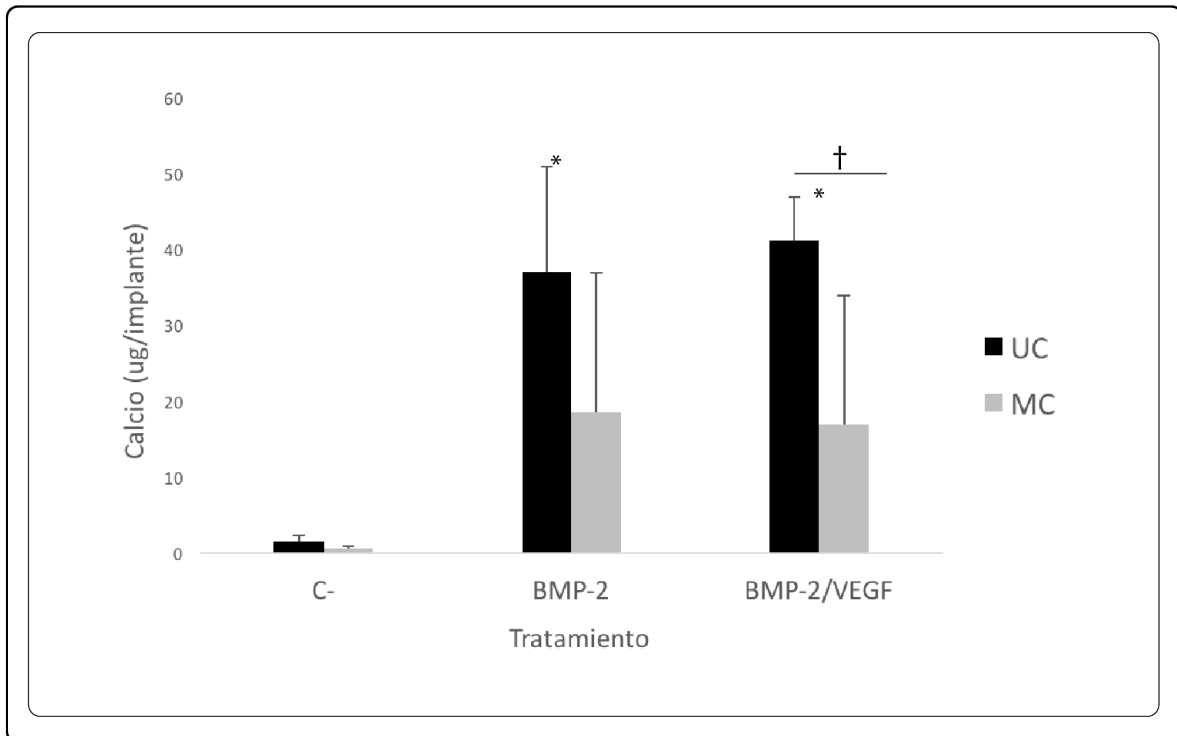




**Figura 37.** Fotografías de secciones histológicas. Se presentan imágenes representativas de cortes de implantes ectópicos 21 días después de la implantación, teñidos con H&E. UC (A, C, E y G); MC (B, D, F y H); cargados con vehículo solamente (A-a y B-b); con 50 ng de VEGF (C-c y D-d); con 500 ng de BMP-2 (E-e y F-f) y con 500 ng BMP-2 + 50 ng VEGF (G-g y H-h). Las imágenes a-h son ampliaciones de sus respectivas fotografías (A-H). Las flechas indican trabéculas óseas mineralizadas conteniendo osteocitos en su interior.

### 5.4.1.2 Cuantificación de Contenido de Calcio

Se midió la cantidad de calcio acumulado en los implantes después de 21 días de implantación. Se excluyó del ensayo la condición de VEGF debido a que histológicamente no se evidenció formación de matriz ósea. En los implantes que no fueron cargados con factores (C-) no se detectó la presencia de calcio por lo que los soportes, por si solos, no presentaron potencial osteogénico. Estos resultados concuerdan con lo observado en las secciones histológicas presentadas en la figura 37 A-a; B-b. La combinación de los soportes con BMP-2 produjo diferencias significativas (Anexo 12) respecto al control, solo en soportes UC (Fig. 39 – *barras negras – asteriscos*). Dentro de cada grupo solo se presentaron diferencias significativas entre UC y MC (Anexo 12) cuando estos se combinaron con los factores BMP-2+VEGF (Fig. 38 – *denotado por †*). Estos resultados confirman lo observado en las secciones histológicas de la figura 37 G-g; H-h. La unidireccionalidad puede influir positivamente en la cantidad de hueso producida ectópicamente en comparación con microestructuras multidireccionales. Esto puede deberse a que la absorción de los factores es más efectiva en este tipo de soportes, como se ha descrito anteriormente. Por otra parte, las propiedades mecánicas de UC al ser superiores respecto a MC permiten que se conserve mejor la microestructura *in vivo*, facilitando la infiltración, adhesión y diferenciación de las células y como consecuencia favoreciendo la producción de una mayor cantidad de hueso.



**Figura 38.** Gráfica de la cuantificación del calcio. Se muestran resultados de cuantificaciones de Ca presente en implantes ectópicos después de 21 días de realizada la implantación. N=10. \*: diferencia significativa de la comparación contra C- (soportes sin citoquinas); †: comparación dentro de cada tratamiento (*t-student*).  $p \leq 0.05$ .

Los factores de crecimiento usados en este ensayo son moléculas que estimulan el crecimiento, migración y diferenciación celular. En el proceso de regeneración ósea se da una participación conjunta de diferentes factores. Entre ellos las BMP que juegan un papel preponderante al iniciar las diferentes etapas de la formación de hueso, incluyendo el reclutamiento de MSC y su diferenciación a osteoblastos. Junto con la osteogénesis, la angiogénesis, influenciada principalmente por la liberación del factor VEGF, es un proceso crucial para la formación de nuevo hueso ya que los vasos sanguíneos que se forman proveen nutrientes y transportan las macromoléculas esenciales para el proceso. Los resultados obtenidos en este ensayo concuerdan con lo reportado anteriormente por otros autores, quienes han relacionado el efecto de la combinación de BMP-2+VEGF con una mayor y más eficiente formación de tejido óseo *in vivo* [138][139][140].

## **5.5 Ensayos *in vitro* con hWJ-MSC**

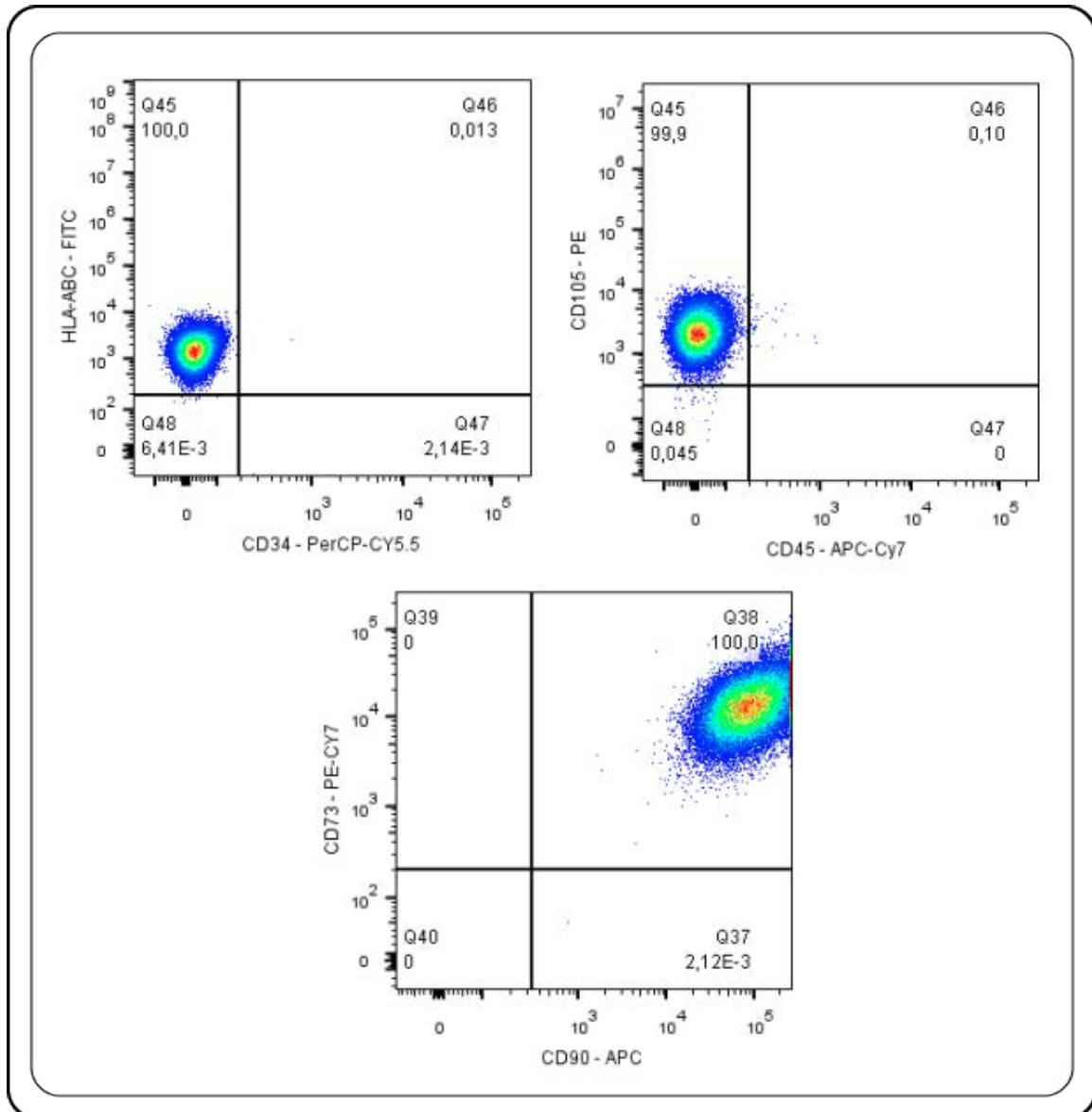
Se evaluó la bioactividad de los soportes sembrados con células madre mesenquimales humanas aisladas de gelatina de Wharthon (WJ-MSC), con el fin de establecer los parámetros iniciales que enmarquen el posible uso futuro de los soportes desarrollados en regeneración de defectos óseos en humanos.

### **5.5.1 Aislamiento y Caracterización de hWJ-MSC**

### **5.5.2 Caracterización Inmunofenotípica**

La caracterización inmunofenotípica de las células realizada mediante citometría de flujo, evidenció la expresión de marcadores de superficie característicos de las células madre mesenquimales (CD73, CD90, CD105 y HLA –ABC) y la ausencia de marcadores de superficie pertenecientes a células de linaje hematopoyético (Fig. 39 y Tabla 10).





**Figura 39.** Citometría de flujo. Se muestran resultados de la evaluación de la presencia de marcadores de superficie característicos de MSC en hWJ-MSC.

**Tabla 10.** Caracterización inmunofenotípica de hWJ-MSC

Anticuerpo	Fluorocromo	Expresión (%)	IMF
CD34	PerCP-CY5-5	0.021	145
CD45	APC-CY7	0.034	7
HLA-DR	Pacific Blue	0.062	1
HLA-ABC	FITC	100	3719
CD73	PE-CY7	100	16039
CD90	APC	83.7	106303
CD105	PE	100	2793

IMF: Intensidad media de fluorescenci<sup>4</sup>

### **5.5.3 Caracterización por Diferenciación *in vitro***

#### **5.5.3.1 Diferenciación Adipogénica**

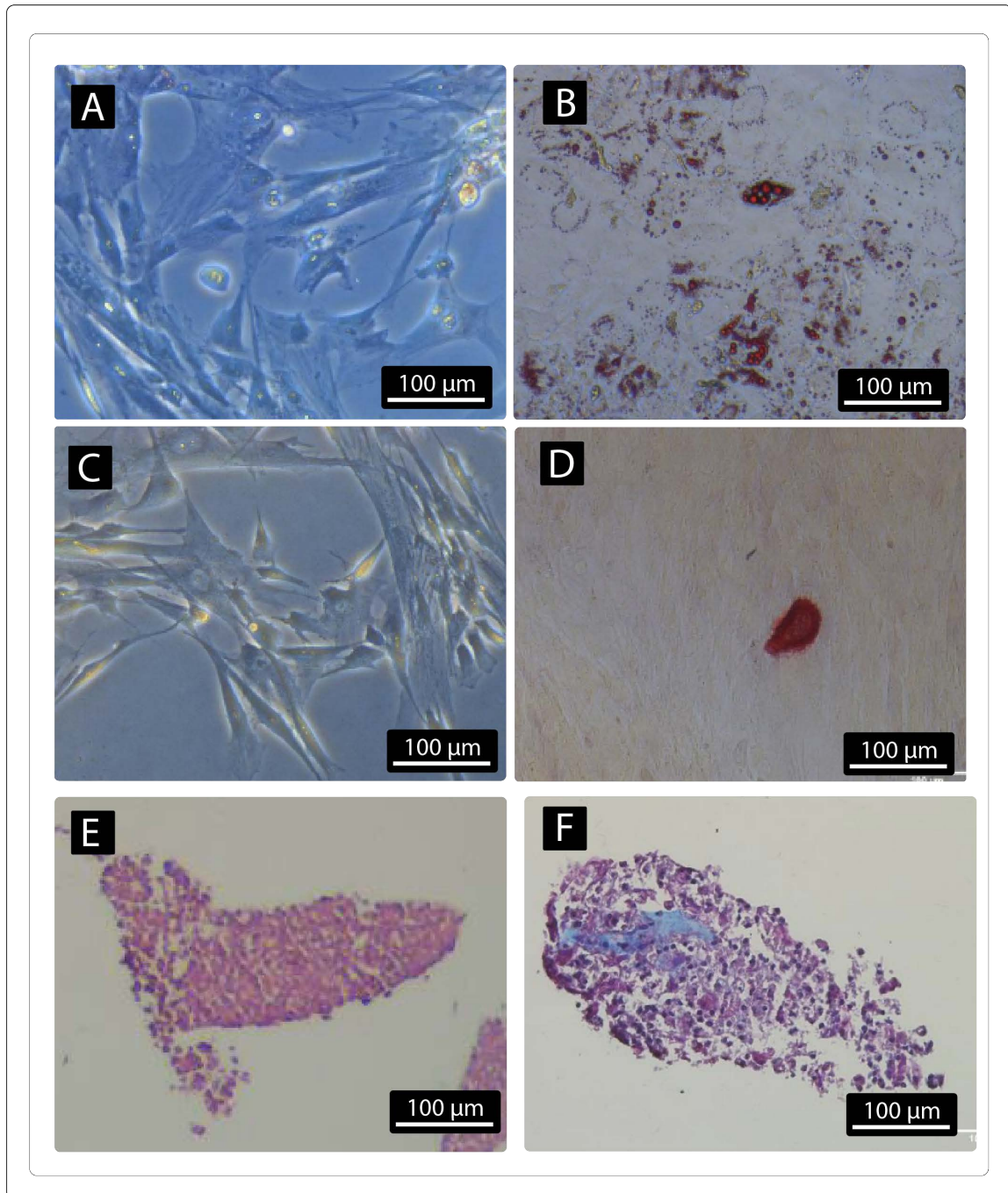
La diferenciación adipogénica se realizó cultivando las hWJ-MSC en medio de cultivo suplementado con factores adipogénicos durante un periodo de 21 días en monocapa. Las células presentaron gran capacidad de diferenciación a este linaje, observándose cambios en la morfología celular, así como en la producción de vesículas de grasa en el interior de la célula. La Figura 40A muestra a las células control no fueron expuestas a medio de diferenciación. Como era de esperarse, mantuvieron su morfología fibroblástica y no formaron vesículas de grasa. En la Figura 40B se observan células diferenciadas con morfología similar a la de adipocitos primarios y con presencia de vesículas de grasa en su interior, teñidas de color rojo por la exposición al colorante oil red.

#### **5.5.3.2 Diferenciación Osteogénica**

Imágenes representativas de las hWJ-MSCs cultivadas por 21 días sin y con medio suplementado con factores osteogénicos se muestran en las Figuras 40 C y D. En presencia de factores osteogénicos las células exhibieron morfología fibroblástica y mostraron capacidad de diferenciación osteogénica; sin embargo, la cantidad de depósitos de calcio, teñidos con rojo de alizarina, fue baja (Fig. 40D).

#### **5.5.3.3 Diferenciación Condrogénica**

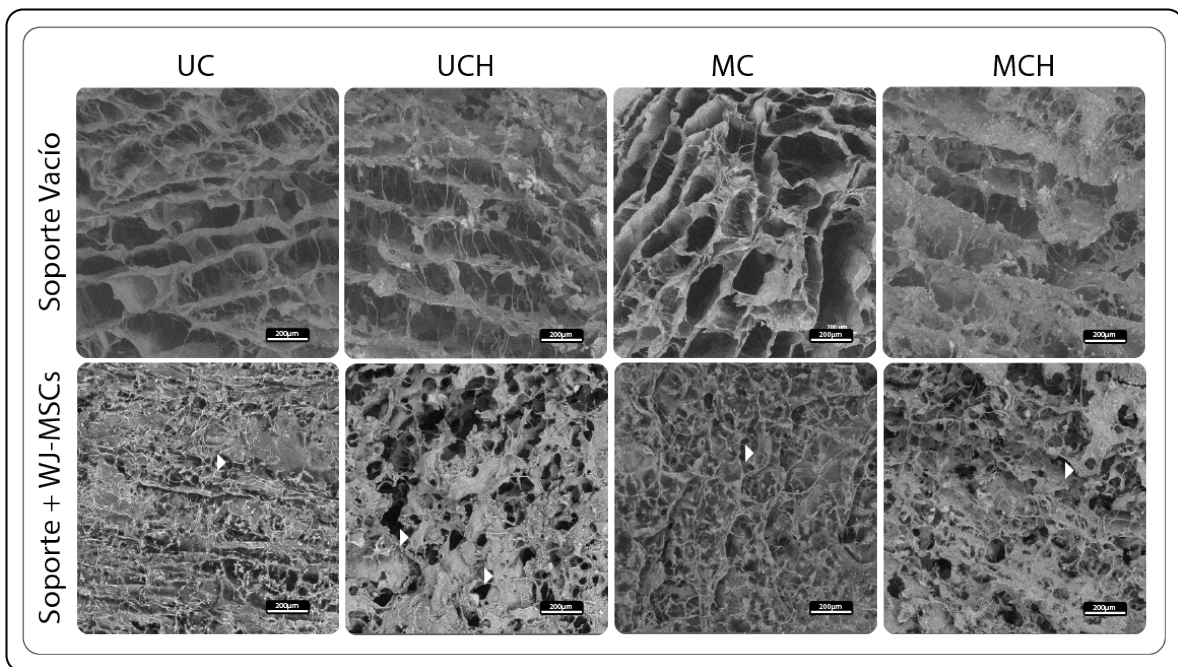
Las hWJ-MSCs fueron cultivadas en medio de cultivo sin y con factores condrogénicos, en un sistema de siembra en pellet, durante 21 días (Fig. 40E y F). En los cultivos control no se observa tinción positiva para tricrómico de masson (Fig. 40E), mientras que en los cultivos con factores de diferenciación condrogénica se observaron zonas de la matriz teñidas de azul que evidencian la producción de colágeno tipo I (Fig. 40F). Estos resultados demostraron la capacidad de diferenciación condrogénica de las hWJ-MSCs al estar expuestas a factores condrogénicos.



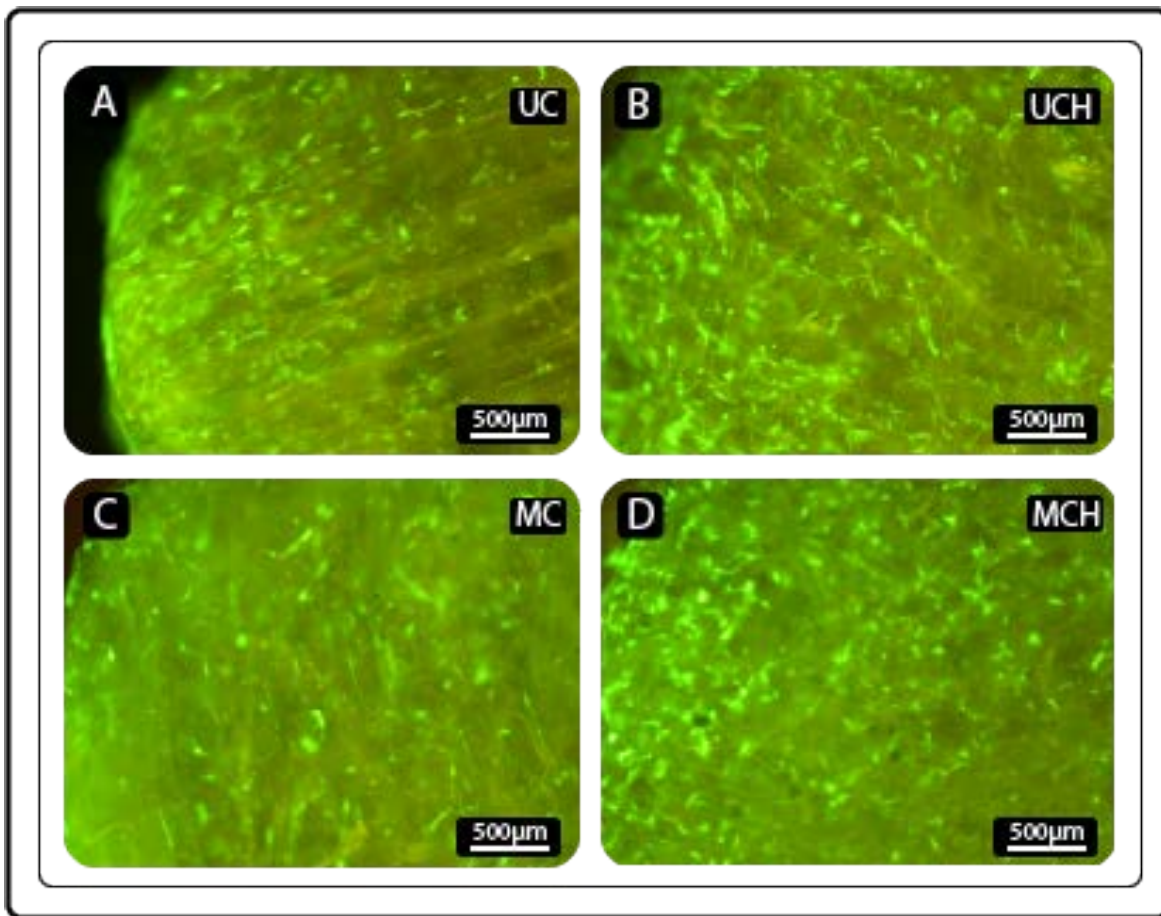
**Figura 40.** Fotografías de hWJ-MSC diferenciadas a linajes adipogénico, osteogénico, y condrogénico *in vitro*. Células cultivadas en ausencia y presencia de factores adipogénicos (A y B, respectivamente); células cultivadas en ausencia y presencia de factores de diferenciación osteogénica (C y D, respectivamente); células cultivadas en ausencia y presencia de factores de diferenciación condrogénica (E y F, respectivamente). Magnificación 20X.

### 5.5.4 Adhesión y Proliferación de hWJ-MSC a los Soportes

Las células hWJ-MSC fueron capaces de adherirse y poblar los soportes, como es evidenciado por las imágenes obtenidos con ESEM (Fig. 41) y con microscopia de fluorescencia (Fig. 42). En las imágenes de ESEM de soportes unidireccionales observan células dispersas adheridas a los soportes en el sentido de la orientación de sus fibras. Las imágenes de microscopia de fluorescencia muestran a las células distribuidas en todo el soporte y orientadas en el sentido de los poros y fibras del soporte. Así, en los soportes UC las células se ven organizadas a lo largo de los poros y aparentemente en mayor densidad hacia los bordes del soporte (Fig. 42A). Las imágenes de las células cultivadas en los soportes MC evidencian la ubicación aleatoria de las mismas en todas las direcciones del soporte. En conjunto estos datos confirman la capacidad que tienen los soportes unidireccionales de dirigir la migración celular, parámetro físico indispensable en la producción de hueso unidireccional.



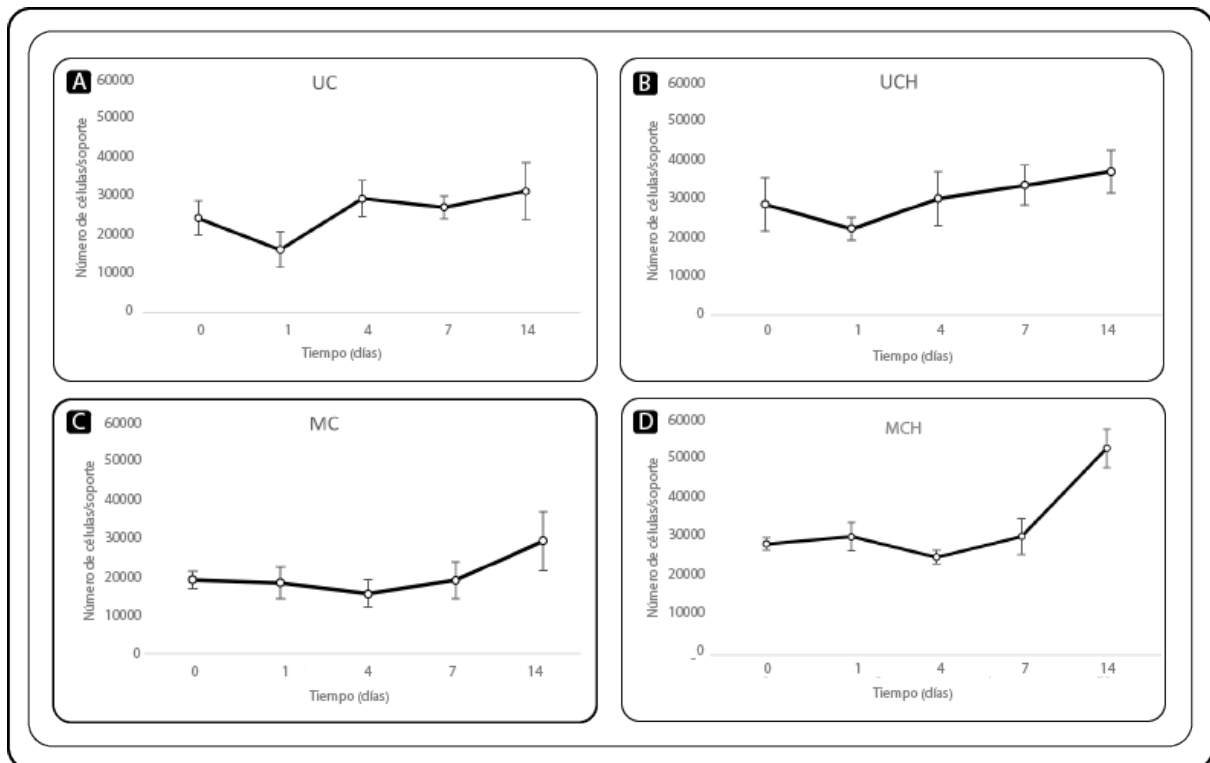
**Figura 41.** Imágenes de ESEM de soportes sembrados con hWJ-MSCs. Las células fueron sembradas en cada uno de los soportes evaluados y cultivadas durante 10 días. Magnificación 150X.



**Figura 42.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de soportes sembrados con hWJ-MSCs. Células hWJ-MSC que expresan proteína fluorescente verde (GFP) fueron sembradas en cada uno de los soportes evaluados y cultivadas durante 10 días. UC (A); UCH (B); MC (C) y MCH (D). Magnificación 4X.

La proliferación de las hWJ-MSC se evaluó mediante el método de MTT. En los soportes UC después 24h de cultivo el número celular disminuyó de  $25000 \pm 5020$  a  $17000 \pm 5800$ , probablemente por estar adaptándose al nuevo microambiente. Durante los siguientes días de el número celular ( $\sim 30000$  células) se mantuvo constante y aumentó en el día 14 (Fig. 43A). En los soportes UCH también ocurrió una disminución inicial del número de células evidenciando la dificultad de las células en adaptarse a la microestructura, sin embargo, a partir del primer día de cultivo el número de células, aumentó hasta  $36604 \pm 3928$  (Fig. 43B). En los soportes MC se observó el mismo comportamiento y las células comenzaron a proliferar a partir del día 4 (Fig. 43C). En los soportes MCH fue donde se observó el mayor crecimiento ya que el número celular

alcanzado en el día 14 fue de  $50023 \pm 4829$ . Los resultados de proliferación con hWJ-MSC difieren de los encontrados en rBM-MSC. Las células humanas parecen adaptarse mejor a la microtopografía y microestructura de los soportes UCH y MCH (Fig. 43B y D) en las que las rBM-MSC no fueron capaces de adherirse (Fig. 31C y E) y proliferar (Fig. 33C y E). Sin embargo, llama la atención que solo se observó proliferación después del día 7, lo cual deja ver la dificultad que tienen las células de adaptarse a estas microestructuras.

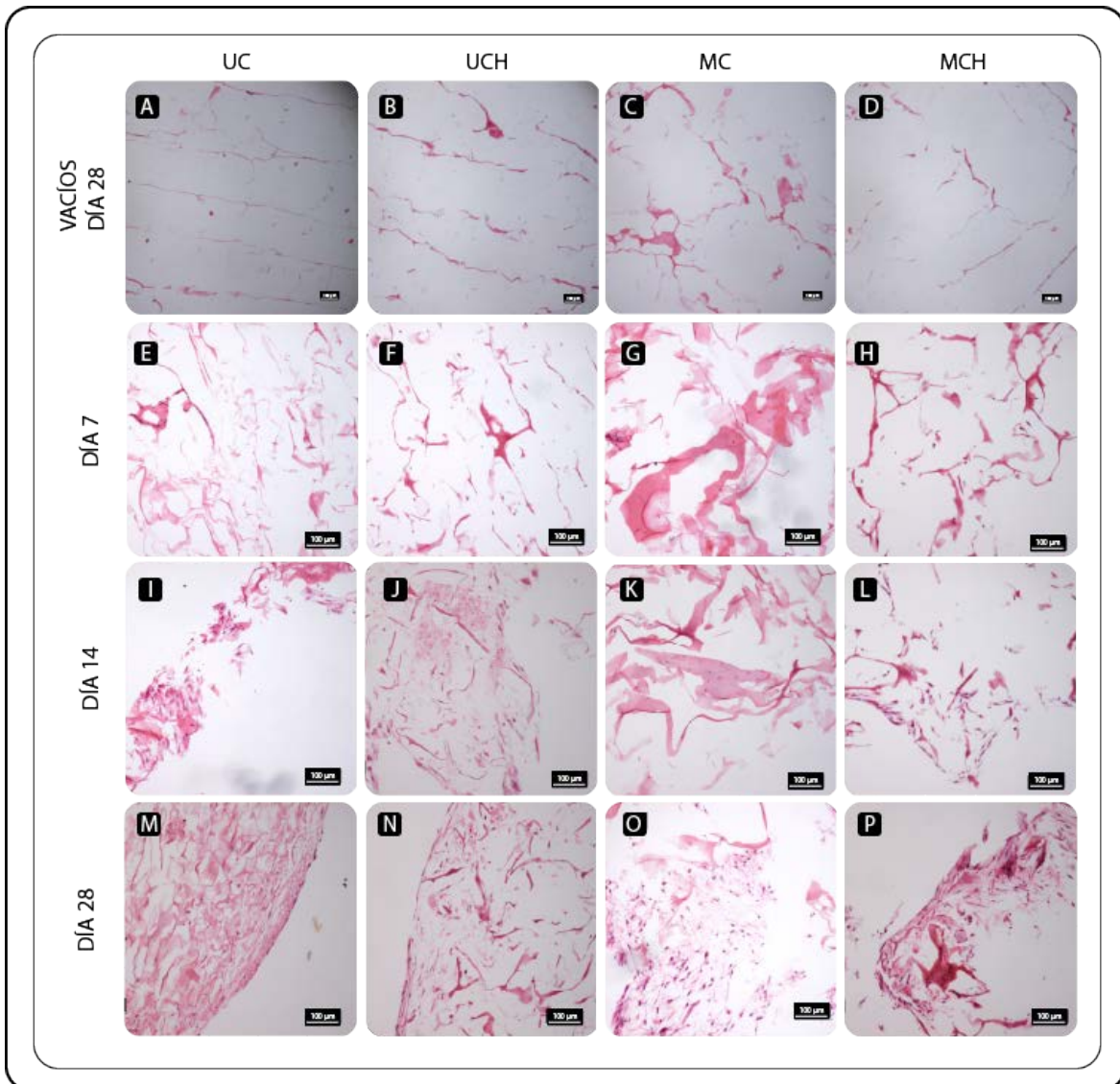


**Figura 43.** Curvas de proliferación de hWJ-MSCs. Células sembradas en UC (A); UCH (B); MC (C) y MCH (D) e incubadas durante 10 días. (media  $\pm$  DE).

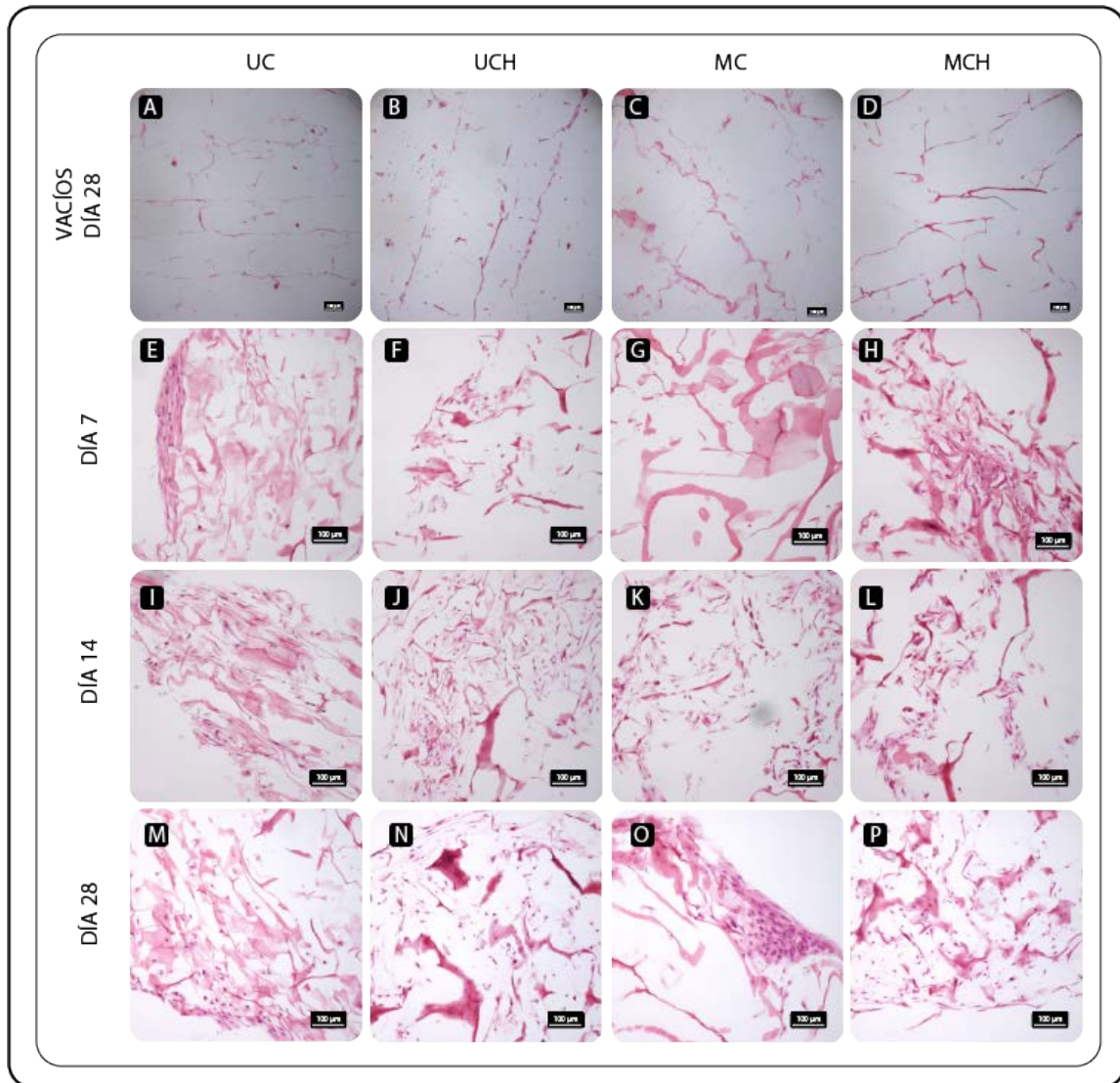
### 5.3.2.3 Biocompatibilidad y Diferenciación de hWJ-MSC Sembradas en los Soportes

Se evaluó la capacidad de las hWJ-MSCs de infiltrar la microestructura y modificarla *in vitro* en cultivos sin (Fig. 44) y con (Fig. 45) factores osteogénicos. En ninguno de los dos casos se observó la formación de matriz extracelular, incluso después de 28 días de cultivo. Sin embargo, en todos los soportes se observó la presencia de células y durante el tiempo de cultivo la densidad celular en cada soporte aumentó. Los soportes + hWJ-MSCs

que se mantuvieron en medio osteogénico presentaron un mayor grado de infiltración y la densidad celular fue mayor en comparación con las condiciones de cultivo sin factores osteogénicos. Se usaron cortes histológicos de soportes vacíos a 28 días en cada condición de cultivo como controles para comparar la apariencia de la microestructura de cada soporte.



**Figura 44.** Imágenes de secciones de los soportes sembrados con hWJ-MSC en condiciones de cultivo estándar. Las muestras fueron teñidas con H&E. Soportes vacíos (sin células) mantenidos en cultivo por 28 días – control, magnificación 4X (A-D); soportes sembrados con hWJ-MSCs mantenidos en cultivo con medio de crecimiento por 7 (E-H), 14 (I-L) y 28 (M-P) días. Magnificación 10X.

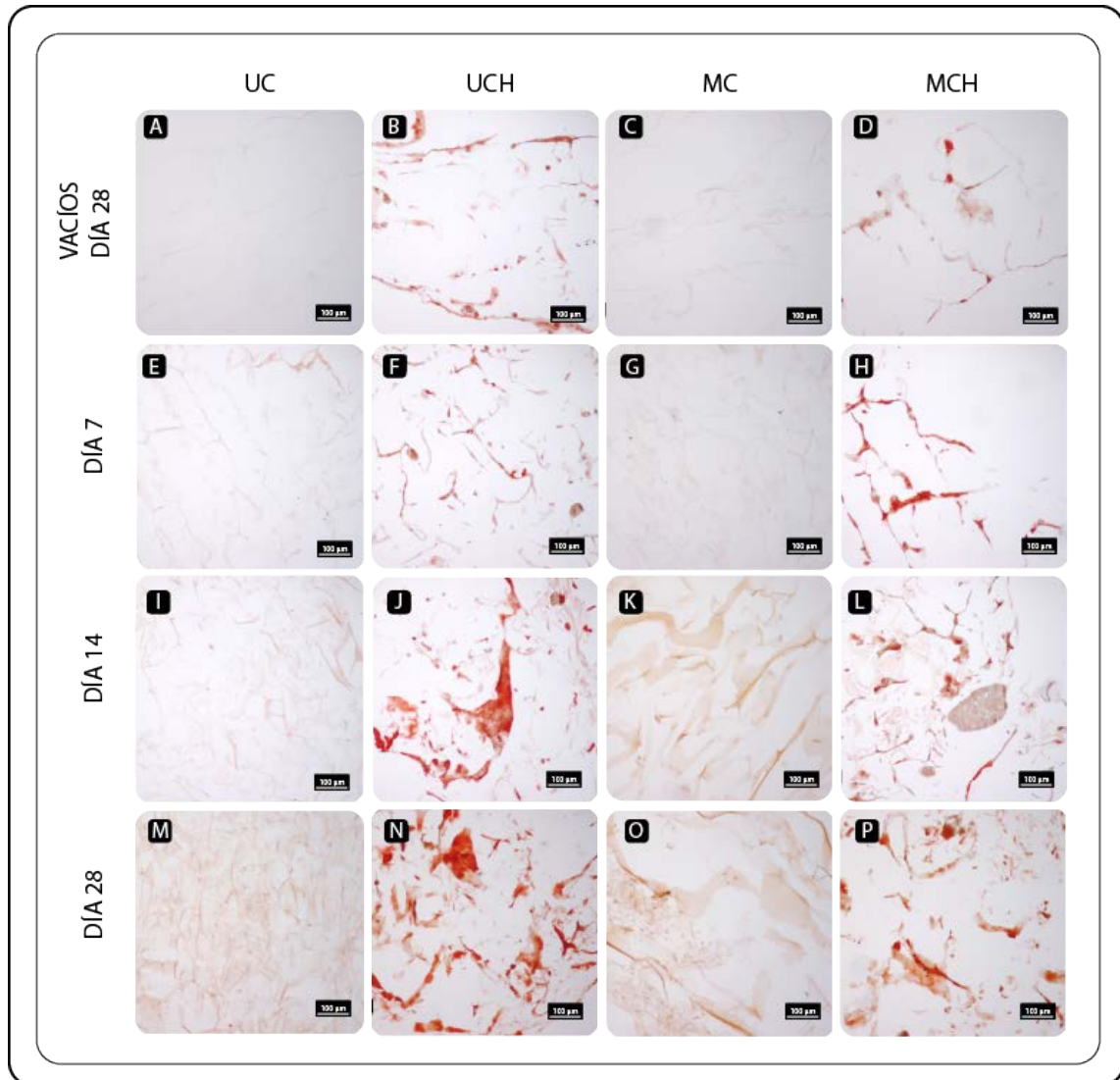


**Figura 45.** Análisis histológico de soportes sembrados con hWJ-MSC en condiciones de cultivo osteogénicas. Las muestras fueron teñidas con H&E. Soportes vacíos (sin células) mantenidos en cultivo por 28 días – control, magnificación 4X (A-D); soportes sembrados con hWJ-MSCs mantenidos en cultivo con medio osteogénico por 7 (E-H), 14 (I-L) y 28 (M-P) días. Magnificación 10X.

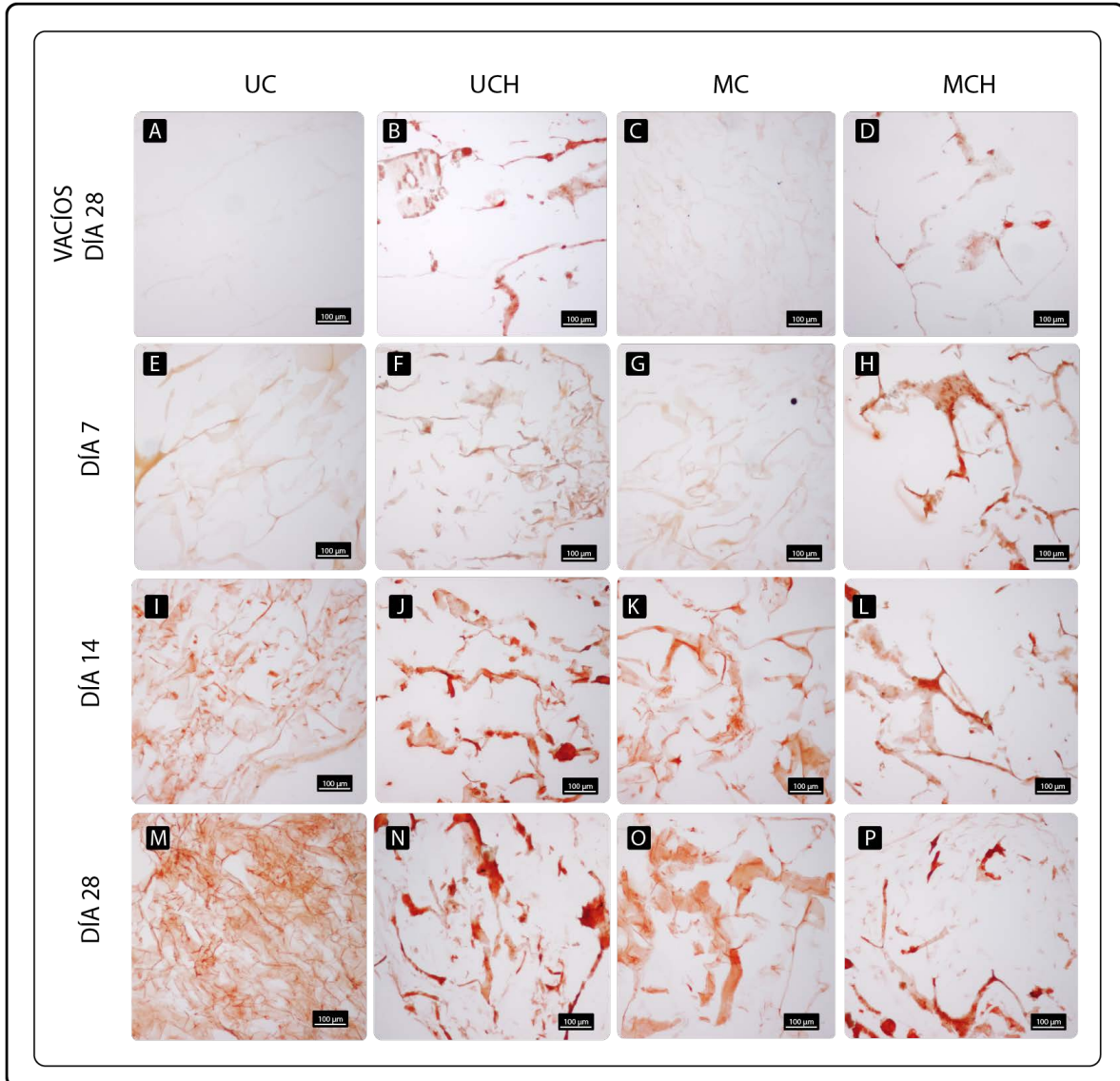
Se realizaron cortes histológicos los cuales se tiñeron con Rojo de Alizarina para evaluar la capacidad de diferenciación de las hWJ-MSC en los soportes. En UC y MC no se observan indicios de diferenciación en ninguno de los tiempos evaluados en medio de cultivo de crecimiento. Por otra parte, en UCH y MCH se observa un aumento en la cantidad de colorante a medida que avanza el tiempo de cultivo indicando la presencia de depósitos de calcio (Fig. 46 A-D). En el medio de cultivo osteogénico se observa mayor presencia de depósitos de calcio en todos los soportes en comparación con el medio de



crecimiento. La combinación de los soportes con factores osteogénicos presentes en el medio favorecen la diferenciación y posterior deposición de minerales (Fig. 47). En UC se observan algunos indicios de deposición de calcio, sin embargo, son muy pocos, mientras que en MC, UCH y MCH se observa un aumento en la tinción a partir del día 14.



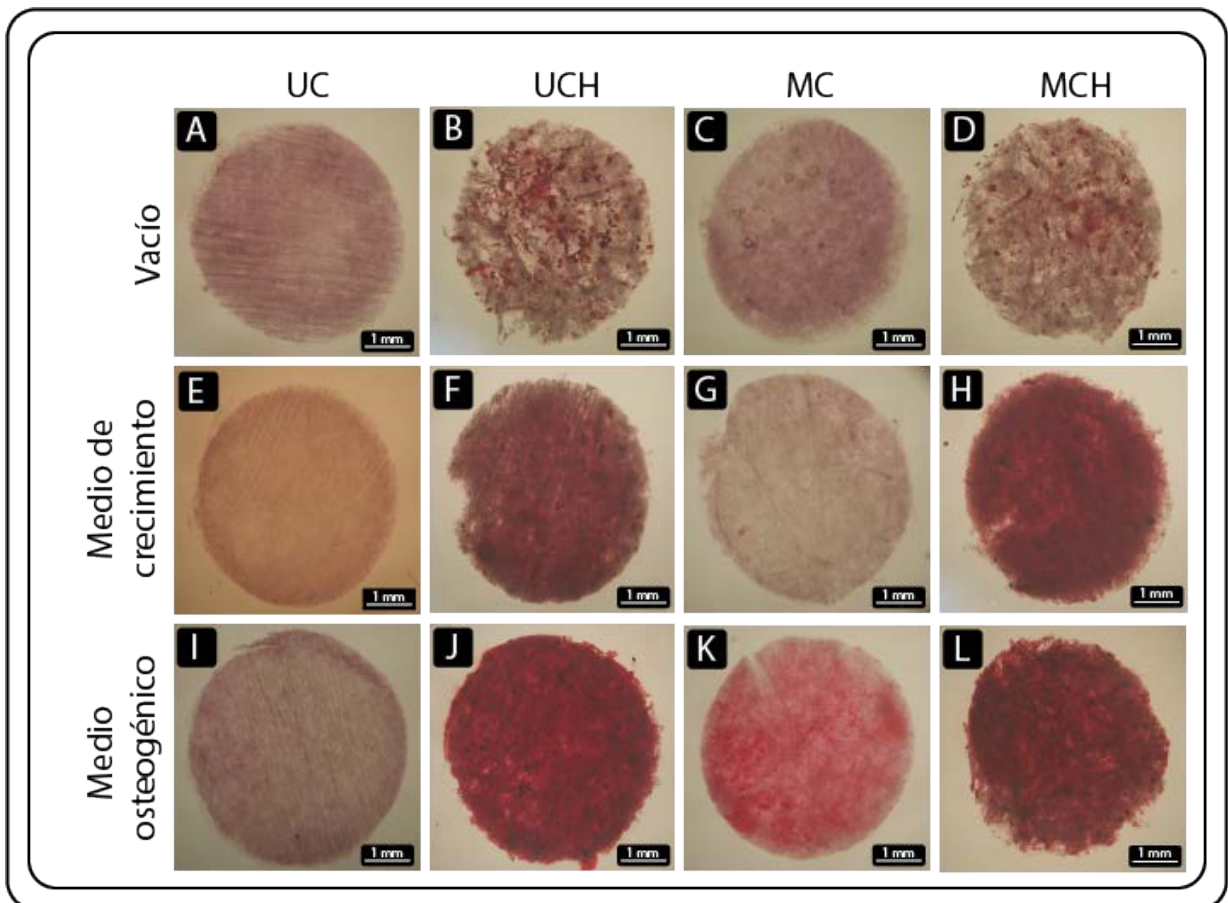
**Figura 46.** Imágenes de secciones histológicas teñidas con Rojo de Alizarina de los soportes sembrados con hWJ-MSC en condiciones de cultivo estándar. Soportes vacíos mantenidos 28 días en cultivo (A-D); soportes con hWJ-MSC mantenidos por 7 (E-H), 14 (I-L) y 28 (M-P) días en medio de crecimiento. Magnificación 10X.



**Figura 47.** Imágenes de secciones histológicas teñidas con Rojo de Alizarina de los soportes sembrados con hWJ-MSC en condiciones de cultivo osteogénico. Soportes vacíos mantenidos 28 días en cultivo (A-D); soportes con hWJ-MSC mantenidos por 7 (E-H), 14 (I-L) y 28 (M-P) días en medio osteogénico. Magnificación 10X.

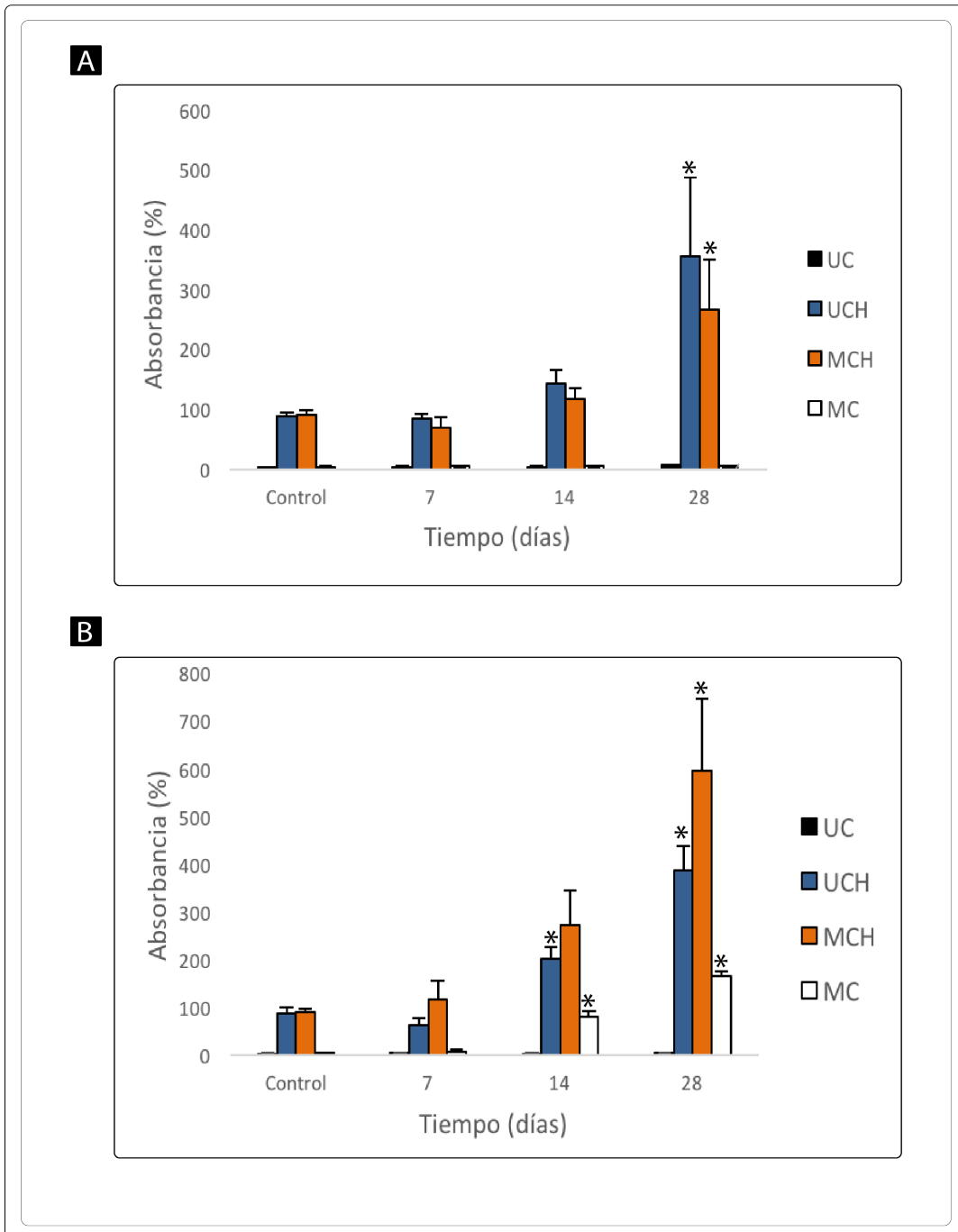
Con el fin de cuantificar los resultados observados en los cortes histológicos teñidos con rojo de alizarina, se realizó un ensayo de mineralización con soportes mantenidos en ambas condiciones de cultivo (medio de crecimiento sin factores *vs.* medio osteogénico). En la Figura 48A-D se observan los soportes sin hWJ-MSC incluidos como control. En los controles de UCH y MCH se observan de color rojo intenso los aglomerados mas grandes de HAP teñidos con el colorante. En Figura 48 E-H se presentan los soportes mantenidos en

medio de crecimiento en los que solo se evidencia la tinción de depósitos de calcio en los soportes que contienen HAp y en los cuales la tinción es claramente mas abundante respecto a sus respectivos controles. Finalmente, en la Figura 47 I-L se muestran los soportes cultivados en medio osteogénico, en los que se observa la presencia de depósitos de calcio en MC, UCH y MCH; sin embargo, estos no fueron detectados en UC. Lo anterior, sugiere que la presencia de HAp y la direccionalidad pueden jugar un papel en la diferenciación de hWJ-MSCs.



**Figura 48.** Fotografías de soportes teñidos con con Rojo de Alizarina para la evaluación de mineralización. Soportes vacíos (control – sin células) (A-D); soportes sembrados con hWJ-MSC y mantenidos en cultivo por 28 días. Medio de crecimiento (E-H); medio osteogénico (I-L).

Mediante la cuantificación del grado de mineralización producido en cada soporte, se encontró que en condiciones de cultivo estándar (medio de cultivo de crecimiento) en los soportes UC y MC no hubo mineralización después de 28 días. Estos datos indican que las hWJ-MSCs no son capaces de diferenciarse en soportes de colágeno tipo I en ausencia de factores osteogénicos. Por otra parte, en UCH y MCH las células si pudieron diferenciarse en condiciones de cultivo estándar. En este caso la presencia de los iones  $\text{PO}_4^{3-}$  de la HAp pudo desencadenar un proceso de diferenciación en ausencia de factores osteogénicos en el medio (Fig. 49A). Sin embargo, se recomienda realizar ensayos adicionales, como inmunohistoquímicas para la detección de marcadores de diferenciación osteogénica (ALP, OPN, OCN) o la cuantificación de ALP, con el fin de corroborar la diferenciación de las hWJ-MSCs bajo las condiciones del ensayo. Estos resultados corroboran datos reportados [141] que demuestran que las células madre mesenquimales humanas aisladas de tejido adiposo (hADSC) pueden diferenciarse a un linaje osteogénico en condiciones estándar de cultivo cuando se siembran en soportes elaborados con Col-I/HAp. Los resultados de mineralización obtenidos en condiciones de cultivo osteogénicas (Fig. 49B) muestran que la combinación de soportes que contienen HAp y medios osteogénicos acelera el proceso de diferenciación en los soportes UCH y MCH (Fig. 48). También se observó mineralización en los soportes MC, aunque en menor medida que en UCH y MCH, demostrando que este tipo de soportes puede usarse en presencia de factores osteogénicos para regeneración. El aumento en la tasa de diferenciación en soportes que contienen HAp también ya fue reportado por otros autores [141] [142].



**Figura 49.** Grafica de la cuantificación de la mineralización después de 28 días de cultivo en medio de crecimiento y en medio osteogénico. Se usaron soportes vacíos como controles para determinar el valor de absorbancia basal de cada soporte. Soportes + hWJ-MSC mantenidos en cultivo de crecimiento (A); soportes + hWJ-MSC mantenidos en cultivo en medio osteogénico (B). \* comparación de cada tipo de soporte respecto a su control.  $p \leq 0.05$ .

## **6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

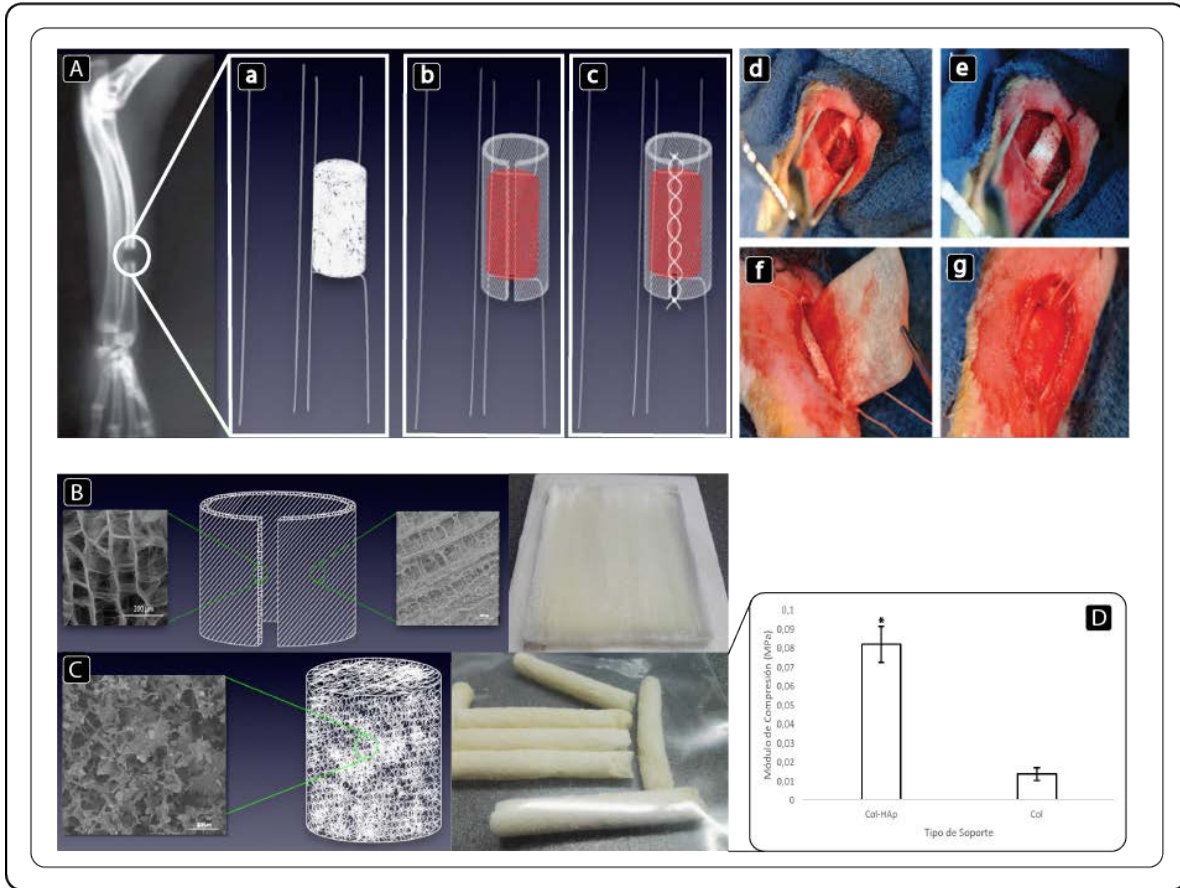
Mediante el proceso de estandarizado en este trabajo se logró producir soportes de colágeno tipo I y colágeno I-hidroxiapatita con poros uni- y multidireccionales. A partir de su caracterización se obtuvo información relevante sobre su microestructura, propiedades mecánicas, fisicoquímicas y biológicas. El método de fabricación basado en congelamiento-liofilización permite obtener soportes altamente porosos con características microestructurales útiles para la ingeniería de tejidos ósea. El tamaño de poro se encuentra entre el rango adecuado para la migración y adhesión celular. La direccionalidad influye en algunas características de los soportes. Mecánicamente, los soportes con microestructuras unidireccionales soportan mejor las cargas de tensión en dirección longitudinal al eje de direccionamiento de sus fibras, mientras que la incorporación de HAp disminuye su resistencia mecánica. La unidireccionalidad también tiene un efecto en la capacidad de absorción de agua en los soportes, ya que aumenta un 42% en comparación con los soportes con poros multidireccionales. La composición y no la orientación de los poros, afecta la degradabilidad de los soportes. La velocidad de degradación de los soportes compuestos de colágeno e hidroxiapatita es menor que la de los soportes elaborados únicamente con colágeno. Esto indica que la tasa de degradación se puede controlar con la composición química de los soportes. A pesar de que los soportes fueron entrecruzados químicamente con glutaraldehído, un agente químico conocido por ser tóxico a altas concentraciones, en la elaboración de los soportes se usó una concentración muy baja (0,02% %p v/v) y se incluyeron procesos de lavado para eliminar los remanentes del entrecruzante; por esta razón, ninguno fue citotóxico. Finalmente las propiedades fisicoquímicas del colágeno tipo I o la hidroxiapatita no se vieron afectadas por el proceso de fabricación.

A partir de los ensayos *in vitro* se observaron comportamientos diferentes en cuanto a proliferación y adhesión de las MSC sembradas en los soportes. Por una parte, las rBM-MSCs solo se adhirieron y proliferaron en soportes UC y MC, mientras que las hWJ-MSC se adhirieron y proliferaron en todos los soportes. Esto sugiere un comportamiento diferencial de los soportes en relación con la fuente celular usada. *In vitro*, la diferenciación osteogénica en presencia de factores osteogénicos fue mayor en soportes multidireccionales; lo cual, sugiere que los soportes multidireccionales son más eficientes presentando los factores osteogénicos y angiogénicos a las células. *In vivo*, se observó lo contrario ya que hubo mayor formación de hueso en los soportes unidireccionales,

probablemente porque son más resistentes mecánicamente y mantienen sus propiedades microestructurales en un ambiente *ectópico*. Además, la unidireccionalidad parece influenciar la deposición de matriz extracelular ósea de manera organizada y similar a la lamelar unidireccional del hueso cortical. Esta característica podría ser un factor determinante en la formación de nuevo hueso con características microestructurales y mecánicas más parecidas al hueso nativo. En este contexto, el desarrollo de soportes unidireccionales puede ser una contribución importante al desarrollo de nuevas estrategias en ingeniería de tejidos ósea. Sin embargo, se recomienda realizar estudios en un modelo ortópico y llevar a cabo estudios preclínicos en modelos de implantación en huesos largos.

En esta conclusión se incluye la Figura 50 que resume el diseño propuesto (Fig. 50A) y los resultados preliminares (Fig. 50B) que permitirán realizar nuevos estudios. Se contempla un diseño en el que soportes unidireccionales laminares se usen con dos funciones principales: 1) servir como membrana de barrera para evitar la incorporación de tejido blando al sitio del defecto, evitando que este interfiera en el proceso de regeneración. Este tipo de infiltración es común en estos defectos; 2) servir como plataforma para guiar la formación unidireccional de hueso, imitando la disposición unidireccional de las fibras de colágeno en las lamelas del hueso cortical. Además se propone que el interior del defecto, se llene con un soporte multidireccional cilíndrico con el fin de inducir la formación de hueso de tipo trabecular. En la Figura 50B se presentan las imágenes de los soportes desarrollados para este fin y la comparativa en las propiedades mecánicas, en términos de módulo de compresión, de soportes cilíndricos compuestos por colágeno o colágeno-hidroxiapatita. A diferencia de las pruebas de tensión, la incorporación de hidroxiapatita mejora las propiedades mecánicas de los soportes en condiciones de compresión, lo cual hace a este el candidato ideal para este diseño.





**Figura 50.** Esquema que muestra el diseño para aplicación de soportes de Col-I y Col-I/HAp en defectos de tamaño crítico en huesos largos. Diseño de implantación en radio de conejo (A), iniciando con la implantación de soportes MCH cilíndricos (a), seguido por la implantación de UC laminar, recubriendo el defecto (b) y finalmente la sutura de UC para asegurar el implante interno (c). Fotografías tomadas del trabajo realizado por [143], basado en la regeneración ósea guiada por membranas y el cual se ha usado para basar el diseño de este trabajo (d-g). Soportes UC laminares (B), soportes MCH cilíndricos (C). Módulo de compresión para soportes cilíndricos de Col-I y Col-HAp. (n=3). \*  $p \leq 0.05$ .

# 7. BIBLIOGRAFÍA



- [1] K. Lewandrowski, J. D. Gresser, D. L. Wise, and D. J. Trantolo, “Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly ( propylene glycol-co-fumaric acid ) -based cement implants in rats,” *Biomaterials*, vol. 21, pp. 757–764, 2000.
- [2] D. Puppi, F. Chiellini, A. . M. Piras, and E. Chiellini, “Polymeric materials for bone and cartilage repair,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 4, pp. 403–440, 2010.
- [3] L. J. Zhou H, “Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering.,” *Acta Biomater.*, vol. 7, 2011.
- [4] N. Merdele *et al.*, “Innovative Biomaterials Based on Collagen-Hydroxyapatite and Doxycycline for Bone Regeneration,” *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 16, p. 5, 2016.
- [5] A. Yousefi, P. F. James, R. Akbarzadeh, A. Subramanian, C. Flavin, and H. Oudadesse, “Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering : A Review,” *Stem Cells Int.*, 2016.
- [6] R. W. Bucholz, J. D. Heckman, C. C.-B. M., and P. Tornetta, *Rockwood and Green’s Fractures in Adults*. Philadelphia, PA:, 2010.
- [7] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu, “Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges,” *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 5, pp. 363–408, 2013.
- [8] P. Baldwin, D. J. Li, D. A. Auston, H. S. Mir, R. S. Yoon, and K. J. Koval, “Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery,” *J. Orthop. Trauma*, vol. 33, no. 4, pp. 203–213, 2019.
- [9] R. Kuhn-Spearing and L. Zioupos, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, p. 10, 1998.
- [10] A. S. Curry, N. W. Pensa, A. M. Barlow, and S. L. Bellis, “Taking cues from the extracellular matrix to design bone-mimetic regenerative scaffolds,” *Matrix Biol.*, no. 2015, pp. 1–16, 2016.
- [11] V. M. García-Garduño and J. Reyes-Gasga, “La Hidroxiapatita, su Importancia en los Tejidos Mineralizados y su Aplicación Biomédica,” *Tip Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9, no. 2, pp. 90–95, 2006.
- [12] I. Zizak Roschger, P., Paris, O, “Characteristics of mineral particles in the human

bone/cartilage interface.,” *J. Struct. Biol.*, vol. 141, no. 3, p. 9, 2003.

- [13] W. J. Landis, “Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces evidence for conventional and high voltage Electron Microscopy and three dimensional imaging,” *J. Structural Biol.*, vol. 117, p. 12, 1996.
- [14] M. J. Olszta *et al.*, “Bone structure and formation: A new perspective,” *Mater. Sci. Eng.*, vol. 58, no. 3–5, pp. 77–116, 2007.
- [15] M. R. y A. B. Susmita Bose, “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, p. 8, 2012.
- [16] S. Gorgieva and V. Kokol, “Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives,” in *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, 2011, pp. 17–50.
- [17] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, and J. E. Ramirez-Vick, “Scaffold Design for Bone Regeneration Liliانا,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 15–56, 2014.
- [18] N. A. M. Barakata, M. S. Khil, A. M. Omran, F. A. Sheikh, and H. Y. Kim, “Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 9, pp. 3408–3415, 2008.
- [19] W. Khoo, F. M. Nor, H. Ardhyanta, and D. Kurniawan, “Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones Using Calcination at Various Temperatures,” *Procedia Manuf.*, vol. 2, no. February, pp. 196–201, 2015.
- [20] V. R. Sinha and A. Trehan, “B iodegradable microspheres for protein delivery,” *J. Control. Release*, vol. 90, pp. 261–280, 2003.
- [21] A. K. Lynn, I. V. Yannas, and W. Bonfield, “Antigenicity and Immunogenicity of Collagen,” *Wiley InterSci.*, pp. 343–354, 2004.
- [22] E. Sachlos, D. Gotora, and J. T. Czernuszka, “Collagen Scaffolds Reinforced with Biomimetic Composite Nano-Sized Carbonate-Substituted Hydroxyapatite Crystals and Shaped by Rapid Prototyping to Contain Internal Microchannels,” *TISSUE Eng.*, vol. 12, no. 9, 2006.
- [23] M. j. Seibel, S. P. Robins, and J. P. Bilezikian, *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. 2006.
- [24] M. J. Glimcher, “The Nature of the Mineral Phase in Bone: Biological and Clinical Implications,” in *Metabolic Bone Disease*, Woodhead Publishing Limited, 1998, p.



23–52e.

- [25] J. A. Buckwalter, M. J. Glimcher, R. R. Cooper, and R. Recker, “Bone Biology,” *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 77, pp. 1256–1275, 2010.
- [26] F. HM., “Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling,” *Calcif. Tissue Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 211–237, 1969.
- [27] E. M. Hauge, D. Qvesel, E. F. Eriksen, L. Mosekilde, and F. Melsen, “Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 16, no. 9, pp. 1575–1582, 2001.
- [28] T. L. Andersen, T. E. Sondergaard, and K. E. Skorzynska, “A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone,” *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 1, pp. 239–247, 2009.
- [29] N. A. Sims and J. H. Gooi, “Seminars in Cell & Developmental Biology Bone remodeling : Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 19, pp. 444–451, 2008.
- [30] K. Matsuo and N. Irie, “Osteoclast – osteoblast communication,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 473, pp. 201–209, 2008.
- [31] S. L. Dallas, M. Prideaux, and L. F. Bonewald, “The osteocyte: an endocrine cell ... and more,” *Endocr. Rev.*, vol. 34, no. 5, pp. 658–690, 2013.
- [32] S. Khosla, M. J. Oursler, and D. G. Monroe, “Estrogen and the skeleton,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 23, no. 11, pp. 576–581, 2012.
- [33] F. F. Safadi *et al.*, “Bone Structure, Development and Bone Biology,” in *Essentials in Bone and Soft-Tissue Pathology*, vol. 2, 2009, pp. 1–50.
- [34] J. G. Belts, P. Desaix, E. Johnson, J. E. Johnson, and O. Korol, *Anatomy & physiology*. Houston, Texas, 2013.
- [35] A. D. Berendsen and B. R. Olsen, “Bone development,” *Bone*, pp. 14–18, 2016.
- [36] C. Maes *et al.*, “Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels,” *Dev Cell*, vol. 19, p. 329–344., 2010.
- [37] G. Karsenty, “The complexities of skeletal biology,” *Nature*, vol. 423, no. 6937, p. 316–8., 2003.
- [38] H. M. Kronenberg, “Developmental regulation of the growth plate,” *Nature*, vol.

423, no. 6937, pp. 332–336, 2003.

- [39] M. Capulli, R. Paone, and N. Rucci, “Osteoblast and osteocyte: games without frontiers,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 561, pp. 3–12, 2014.
- [40] S. C. Marks Jr, “Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton,” *Am. J. Anat.*, vol. 183, pp. 1–44, 1988.
- [41] R. Florencio-silva, G. Rodrigues, E. Sasso-cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells,” *Biomed Res. Int.*, p. 17, 2015.
- [42] P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, and G. Karsenty, “Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation,” *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 747–754, 1997.
- [43] E. M. Aarden, E. H. Burger, and P. J. Nijweide, “Function of Osteocytes in Bone,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 55, pp. 287–299, 1994.
- [44] P. J. Nijweide, E. H. Burger, and J. Klein-Nulend, “The Osteocyte,” in *Principles of Bone Biology*, 2002, pp. 93–107.
- [45] J. D. Currey, *Bones: Structure and Mechanics*. Princeton University Press, 2013.
- [46] E. H. Burger and J. Klein-nulend, “Mechanotransduction in bone — role of the lacuno- canalicular network,” *FASEB J. Vol.*, vol. 13, pp. 101–112, 1999.
- [47] R. L. Duncan and C. H. Turner, *Mechanotransduction and the Functional Response of Bone to Mechanical Strain*, vol. 57. 1995.
- [48] L. Arboleya and S. Castañeda, “Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso,” *Rev Osteoporos Metab Min.*, vol. 6, no. 4, pp. 109–121, 2014.
- [49] J. Rubin and E. M. Greenfield, “Osteoclast: Origin and Differentiation,” in *Bone Resorption*, Londoin: Springer, 2005.
- [50] K. Väänänen and H. Zhao, “Osteoclast Function,” in *Principles of Bone Biology*, 2002, pp. 127–139.
- [51] J. L. Brown, G. K. Sangamesh, and C. T. Laurencin, “Bone Tissue Engineering,” in *Principles of Regenerative Medicine*, 2008, pp. 1194–1214.
- [52] Lanka, “Difference Between Osteoblast and Osteoclast,” *Epediaa*, 2017.
- [53] J. D. Currey, *Bones: Structure and Mechanics*. 2002.
- [54] C. H. Turner, “Bone Strength : Current Concepts,” *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 446, pp.



429–446, 2006.

- [55] J. A. Buckwalter and R. . Cruess, “Healing of musculoskeletal tissues.” *Rockwood Greeny Fract. itz Adults.*, p. 181–222., 1991.
- [56] J. D. Currey, “The Mechanical Adaptatioizs of Bones.” *Princeton, New Jersey. Princet. Univ. Press.*, 1984.
- [57] R. R. Recker, “Embryology. anatomy. and microstructure of bone.” *Disord. ofBone Miner. Metaholism.*, p. 219–240., 1992.
- [58] E. N. Marieb and K. Hoehn, *Human anatomy & physiology*, 9th ed. Boston, 2006.
- [59] X. Wang *et al.*, “Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants : A review,” *Biomaterials*, vol. 83, pp. 127–141, 2016.
- [60] W. Xiaojian *et al.*, “Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review,” *Biomaterials*, vol. 83, p. 14, 2016.
- [61] L. Libonati and F. Vergani, “Understanding the structure–property relationship in cortical bone to design a biomimetic composite,” *Compos. Struct.*, vol. 139, p. 10, 2016.
- [62] D. B. Burr *et al.*, “Does microdamage accumulation affect the mechanical properties of bone?,” *J. Biomech.*, vol. 31, pp. 337–345, 1998.
- [63] R. Marsell and T. A. Einhorn, “The Biology of Fracture Healing,” *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 551–555, 2012.
- [64] A. Oryan, S. Monazzah, and A. Bigham-sadegh, “Bone Injury and Fracture Healing Biology,” *Biomed Env. Sci*, vol. 28, no. 1, pp. 57–71, 2015.
- [65] I. P. Renart and A. Rodríguez de la Serna, “Consolidación de las fracturas,” *Arthros*, vol. VII, pp. 6–32, 2016.
- [66] J. R. Lieberman and G. E. Friedlaender, *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. 2007.
- [67] K. Tsuji *et al.*, “BMP2 activity , although dispensable for bone formation , is required for the initiation of fracture healing,” *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 12, pp. 1424–1429, 2006.
- [68] F. Loi, L. A. Córdova, J. Pajarinen, T. Lin, Z. Yao, and S. B. Goodman,

“Inflammation, Fracture and Bone Repair Florence,” *HHS Public Access*, vol. 86, pp. 119–130, 2017.

- [69] K. Huether, S., & McCance, *Understanding pathophysiology*, 5ta ed. St. Louis: Mosby, 2013.
- [70] A. Shafiee and A. Atala, “Tissue Engineering : Toward a New Era of Medicine,” *Annu. Rev. Med. is*, vol. 68, pp. 29–40, 2017.
- [71] J. J. Pavón, A. Pesquet, R. M. Echeverry, and S. M. Restrepo, “Procesamiento, CAaracterización y Ensayos Biológicos de Scaffolds Polimericos Naturales y Sintéticos para Ingeniería de Tejidos Ósea y Cartilaginosa,” *Rev. Politécnica*, vol. 10, no. 19, 2014.
- [72] M. E. Gomes, M. Rodrigues, R. Domingues, and R. L. Reis, “Tissue Engineering and Regenerative Medicine: New trends and directions/A Year in Review Tissue,” *TISSUE Eng.*, pp. 1–42, 2017.
- [73] D. W. Hutmacher, “Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives.,” *J. Biomater.*, vol. 12, p. 17, 2001.
- [74] X. Liu and P. X. Ma, “Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 32, no. 3, p. 9, 2004.
- [75] M. A. Velasco, C. A. Narváez-tovar, and D. A. Garzón-alvarado, “Design , Materials , and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, p. 21, 2015.
- [76] M. G. Patino, S. Andreana, B. Noble, R. E. Cohen, and M. E. Neiders, “Collagen: an overview.,” *Implant Dent*, vol. 11, p. 5, 2002.
- [77] A. M. Ferreira, V. Chiono, G. Ciardelli, and P. Gentile, “Collagen for bone tissue regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 8, p. 9, 2012.
- [78] A. Bhattacharjee and M. Bansal, “Collagen Structure: The Madras Triple Helix and the Current Scenario,” *IUBMB Life*, vol. 57, no. March, pp. 161–172, 2005.
- [79] K. Smith Deanne, “Calcium phosphate apatites in nature. ,” *Hydroxyapatite Relat. Mater.*, p. 8, 2000.
- [80] P. K. Ducheyne, L. L. Hench, A. Kagan, M. Martens, A. Bursens, and J. C. Mulier, “Effect of hydroxyapatite impregnation on skeletal bonding of porous coated implants.,” *J Biomed Mater Res*, vol. 14, p. 8, 1980.





- [81] D. Shi, "Biomaterials and Tissue Engineering," *Biol. Med. PHYSICS, Biomed. Eng.*, p. 254, 2004.
- [82] S. Rujitanapanich, P. Kumpapan, and P. Wanjanoi, "Synthesis of Hydroxyapatite from Oyster Shell via Precipitation," *Energy Procedia*, vol. 56, pp. 112–117, 2014.
- [83] R. J. Kane *et al.*, "Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties," *Acta Biomater.*, vol. 17, p. 9, 2015.
- [84] D. A. Wahl and J. T. Czernuszka, "Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair," *Eur. Cells Mater.*, vol. 11, pp. 43–56, 2006.
- [85] D. F. Williams, *Definitions in Biomaterials. Progress in Biomedical Engineering*,. Amsterdam, 1987.
- [86] L. E. Freed *et al.*, "Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering," *Nature*, vol. 12, pp. 689–93, 1994.
- [87] S. Prasad and R. Wen Wong Chung, "Unraveling the mechanical strength of biomaterials used as a bone scaffold in oral and maxillofacial defects," *Oral Sci. Int.*, vol. 15, no. 2, pp. 48–55, 2018.
- [88] E. Suesca, "Optimización de la Obtención de Soportes de Colágeno su Microestructura en el Desarrollo de Mucosa Oral Artificial," Universidad Nacional de Colombia, 2013.
- [89] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 5474–5491, 2005.
- [90] N. W. Marion and J. J. Mao, "Mesenchymal Stem Cells and Tissue Engineering," *Methods Enzym.*, vol. 420, no. 6, pp. 339–361, 2014.
- [91] A. J. Rosenbaum, D. A. Grande, and J. S. Dines, "The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering A global assessment," *Organogenesis*, vol. 4, no. March, pp. 23–27, 2008.
- [92] A. Dehghanifard, M. Shahjahani, M. Soleimani, and N. Saki, "The Emerging Role of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering," *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 8–9, 2013.
- [93] J. M. Seong, B. Kim, J. Park, I. K. Kwon, A. Mantalaris, and Y. Hwang, "Stem cells in bone tissue engineering," *Biomed Mater*, vol. 62001, no. 5, 2010.
- [94] M. Akram and R. Ahmed, "Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural



resources,” *J Mater Sci*, vol. 49, pp. 1461–1475, 2014.

- [95] J. Sanchez, “Desarrollo de Soportes de Colágeno Tipo I con Partículas de Colágeno Tipo I - Hidroxiapatita, con Potencial Aplicación en Regeneración Ósea,” Universidad Nacional de Colombia, 2018.
- [96] S. Dey and S. Pal, “Evaluation of Collagen-hydroxyapatite Scaffold for Bone Tissue Engineering,” pp. 1267–1270, 2009.
- [97] N. N. Panda and S. Jonnalagadda, “Development and evaluation of cross-linked collagen-hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering,” *J. Biomater. Sci.*, no. August 2013, pp. 37–41, 2013.
- [98] D. A. Wahl, E. Sachlos, C. Liu, and J. T. Czernuszka, “Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering,” pp. 201–209, 2007.
- [99] H. Wu *et al.*, “Development and Characterization of a Bioinspired Bone Matrix with Aligned Nanocrystalline Hydroxyapatite on Collagen Nanofibers,” *Materials (Basel)*, 2016.
- [100] G. M. Cunniffe, G. R. Dickson, S. Partap, and K. T. Stanton, “Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering .,” *Mater. Med.*, vol. 21, no. 8, 2010.
- [101] C. Zaharia, Ş. T. Marin, and I. Cristescu, “Collagen-fibroin-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering,” *ICAMS*, 2016.
- [102] ASTM, “C1424-10 - Standard test method for monotonic compressive strength of advanced ceramics at ambient temperature,” *West Conshohocken, PA ASTM Int.*, 2015.
- [103] R. J. Kane and R. K. Roeder, “Effects of hydroxyapatite reinforcement on the architecture and mechanical properties of freeze-dried collagen scaffolds,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 7, pp. 41–49, 2012.
- [104] J. Black and R. U. Mattson, “Relationship Between Porosity and Mineralization,” *Calcif Tissue Int*, vol. 34, pp. 332–336, 1982.
- [105] K. A. Hing, S. M. Best, and W. Bonfield, “Characterization of porous hydroxyapatite,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 10, pp. 135–145, 1999.
- [106] R. J. Kane *et al.*, “Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties q,” *ACTA Biomater.*, no. January, p. 12,

2015.

- [107] M. Madaghiele, A. Sannino, I. V Yannas, and M. Spector, “Collagen-based matrices with axially oriented pores,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, pp. 757–767, 2007.
- [108] S. C. Rodrigues, “Preparation of Collagen-Hydroxyapatite Biocomposite Scaffolds by Cryogelation Method for Tissue Engineering Applications This thesis was supervised by ;,” 2011.
- [109] ISO, “Biological evaluation of medical devices. Part 5: In Vitro cytotoxicity test. Guideline UNE-EN ISO 10993-5,” 2009.
- [110] A. Sionkowska and J. Kozłowska, “International Journal of Biological Macromolecules Properties and modification of porous 3-D collagen / hydroxyapatite composites,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 52, pp. 250–259, 2013.
- [111] M. Dominici *et al.*, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement,” *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–7, 2006.
- [112] G. Salguero *et al.*, “Preconditioning Therapy with Lentiviral Vector-Programmed Dendritic Cells Accelerates the Homeostatic Expansion,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 1224, no. October, pp. 1209–1224, 2011.
- [113] P. Thevenot *et al.*, “Method to Analyze Three-Dimensional Cell Distribution and Infiltration in Degradable Scaffolds,” *TISSUE Eng. Part C*, vol. 14, no. 4, 2008.
- [114] G. Calabrese *et al.*, “Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro,” *PLoS One*, pp. 1–17, 2016.
- [115] C. A. Gregory, W. G. Gunn, A. Peister, and D. J. Prockop, “An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture : comparison with cetylpyridinium chloride extraction,” *Anal. Biochem.*, vol. 329, pp. 77–84, 2004.
- [116] N. M. Pareja, D. M. E. Claudia, C. P. Ossa, and A. Echavarría, “Síntesis y caracterización de hidroxiapatita microporosa , comparación con un producto comercial Synthesis and characterization of microporous hydroxyapatite , comparison with a commercial product,” *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, no. 433, pp. 67–76, 2008.
- [117] S. A. Bello, E. Pereira, and M. R. Fontanilla, “Elaboración de tejido conectivo artificial autólogo de mucosa oral y evaluación de su desempeño como cobertura

biológica en lesiones mucosas inducidas en conejos,” *Rev. Fed. Odontol. Colomb*, vol. 20, pp. 12–28, 2004.

- [118] J. N. Sanz De Santamaria, F. Soto Montoya, C., Franky, L. Eduardo, and L. De Larrauri, “Banco de Huesos y Tejidos Fundacion Cosme y Damian,” *Acta Otorrinolaringol. cirugía cabeza y cuello*, vol. 35, no. 2, p. 58–64., 2007.
- [119] H. Wu *et al.*, “Development and Characterization of a Bioinspired Bone Matrix with Aligned Nanocrystalline Hydroxyapatite on Collagen Nanofibers,” vol. 9, no. 3, p. 198, 2016.
- [120] M. M. C. G. Silva *et al.*, “The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5909–5917, 2006.
- [121] P. Chocholata, V. Kulda, and V. Babuska, “Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration,” *Materials (Basel)*., vol. 12, p. 25, 2019.
- [122] A. Salerno, D. Guarnieri, M. Iannone, S. Zeppetelli, and Paolo A. Netti, “Effect of Micro- and Macroporosity of Bone Tissue Three-Dimensional-Poly(e-Caprolactone) Scaffold on Human Mesenchymal Stem Cells Invasion, Proliferation, and Differentiation In Vitro,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 8, 2010.
- [123] C. M. Murphy and F. J. O’Brien, “Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds,” *Cell Adh. Migr.*, vol. 2, no. 3, pp. 377–381, 2010.
- [124] K. Whang *et al.*, “Engineering Bone Regeneration with Bioabsorbable Scaffolds with Novel Microarchitecture,” *TISSUE Eng.*, vol. 5, no. 1, pp. 35–51, 1999.
- [125] M. Tanaka, H. Haniu, T. Kamanaka, and T. Takizawa, “Physico-Chemical, In Vitro, and In Vivo Evaluation of a 3D Unidirectional Porous Hydroxyapatite Scaffold for Bone Regeneration,” *Materials (Basel)*., vol. 10, pp. 1–13, 2017.
- [126] E. Suesca, M. A. Dias, M. E. M. Braga, H. C. De Sousa, and M. R. Fontanilla, “Multifactor analysis on the effect of collagen concentration , cross-linking and fi ber / pore orientation on chemical , microstructural , mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 333–341, 2017.
- [127] S. K. Padmanabhan *et al.*, “Synthesis and Characterization of Collagen Scaffolds

Reinforced by Eggshell Derived Hydroxyapatite for Tissue Engineering,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 15, pp. 504–509, 2015.

- [128] K. Maji, S. Dasgupta, K. Pramanik, and A. Bissoyi, “Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering,” *Int. J. Biomater.*, p. 14, 2016.
- [129] M. Eslaminejad, F. Bagheri, M. Zandi, E. Nejati, E. Zomorodian, and M. Hourii, “Comparison of proliferation and osteoblast differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells on nano- and micro-hydroxyapatite contained composite scaffolds,” *Iran. J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 4, pp. 234–242, 2010.
- [130] H. Ahn, W. Lee, K. Kwack, and Y. Do Kwon, “FGF2 stimulates the proliferation of human mesenchymal stem cells through the transient activation of JNK signaling,” *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 17, pp. 2922–2926, 2009.
- [131] M. Rodrigues, L. G. Griffi, and A. Wells, “Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 1, no. 32, pp. 1–12, 2010.
- [132] A. I. Hoch and K. Leach, “Concise Review: Optimizing Expansion of Bone Marrow Mesenchymal Stem / Stromal Cells for Clinical Applications,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 3, pp. 643–652, 2014.
- [133] J. Lou, Y. Tu, S. Li, and P. R. Manske, “Involvement of ERK in BMP-2 Induced Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Progenitor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 762, pp. 757–762, 2000.
- [134] A. Minamide *et al.*, “The Effects of Bone Morphogenetic Protein and Basic Fibroblast Growth Factor on Cultured Mesenchymal Stem Cells for Spine Fusion,” 2003.
- [135] X. Kong *et al.*, “VEGF promotes the proliferation of bone marrow derived mesenchymal stem cells through ERK1/2 signal pathway,” *J. Exp. Hematol. Assoc. Pathophysiol.*, vol. 18, p. 1292, 2010.
- [136] Y. Bai *et al.*, “BMP-2, VEGF and bFGF synergistically promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 35, pp. 301–308, 2013.
- [137] M. Sukul, N. T. B. Linh, Y.-K. Min, S.-Y. Lee, and B.-T. Lee, “Effect of local



sustainable release of BMP2-VEGF from nano-cellulose loaded in sponge biphasic calcium phosphate (BCP) on bone regeneration,” *Tissue Eng. Part A*, pp. 1–54, 2019.

- [138] H. Peng *et al.*, “VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 20, no. 11, 2005.
- [139] Z. S. Patel, S. Young, Y. Tabata, J. A. Jansen, M. E. K. Wong, and A. G. Mikos, “Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model,” *Bone*, vol. 43, pp. 931–940, 2008.
- [140] D. H. R. Kempen *et al.*, “Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 14, pp. 2816–2825, 2009.
- [141] G. Calabrese, R. Giuffrida, C. Fabbi, E. Figallo, and D. Lo, “Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro,” *PLoS One*, pp. 1–17, 2016.
- [142] D. Pasqui, P. Torricelli, M. De Cagna, and M. Fini, “Carboxymethyl cellulose - hydroxyapatite hybrid hydrogel as a composite material for bone tissue engineering applications,” *J Biomed Mater Res Part A*, vol. 102A, pp. 1568–1579, 2014.
- [143] T. Guda *et al.*, “Guided Bone Regeneration in Long-Bone Defects with a Structural Hydroxyapatite Graft and Collagen Membrane,” *Tissue Eng. part A*, vol. 19, 2013.

## 8. ANEXOS

## 8.1 Anexo 1: Análisis Estadístico para Porosidad y Tamaño de Poro

Pruebas de normalidad

Soporte	Estadístico	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		Estadístico	Shapiro-Wilk		
		gl	Sig.		gl	Sig.	
Porosidad	uc	,186	3	.	,998	3	,919
	mc	,184	3	.	,999	3	,926
	uch	,239	3	.	,975	3	,698
	mch	,272	3	.	,946	3	,554
Tamaño de poro	uc	,217	3	.	,988	3	,790
	mc	,274	3	.	,944	3	,544
	uch	,216	3	.	,989	3	,796
	mch	,182	3	.	,999	3	,936

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Variable dependiente	Categoría	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
	Se basa en la mediana	,535	3	8	,671
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,535	3	5,745	,676
	Se basa en la media recortada	,951	3	8	,461
Tamaño de poro	Se basa en la media	,565	3	8	,653
	Se basa en la mediana	,290	3	8	,832
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,290	3	6,320	,832
	Se basa en la media recortada	,545	3	8	,665

ANOVA

Variable dependiente	Categoría	Suma de cuadrados		gl	Media cuadrática	F	Sig.
		Entre grupos	Dentro de grupos				
Porosidad	Entre grupos	41,663	13,888	3	13,888	12,136	,002
	Dentro de grupos	9,155	1,144	8	1,144		
	Total	50,818	11				
	Total	5301,096	3	1767,032	,046	,986	
Tamaño de poro	Entre grupos	307451,813	38431,477	8	38431,477		
	Dentro de grupos	312752,909	11				
	Total						
	Total						

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(i) Soporte	(j) Soporte	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Porosidad	uc	mc	-2,5935667	,8734518	,069	-5,390667	,203533
		uch	-,1291333	,8734518	,999	-2,667967	2,926233
		mch	2,6749667	,8734518	,061	-,122133	5,472067
	mc	uc	2,5935667	,8734518	,069	-,203533	5,390667
		uch	2,7227000	,8734518	,056	-,074400	5,519800
		mch	5,2685333	,8734518	,001	2,471433	8,065633
	uch	uc	-,1291333	,8734518	,999	-2,926233	2,667967
		mc	-2,7227000	,8734518	,056	-5,519800	,074400
		mch	2,5458333	,8734518	,075	-,251267	5,342933
	mch	uc	-2,6749667	,8734518	,061	-5,472067	,122133
		mc	-5,2685333	,8734518	,001	-8,065633	-2,471433
		uch	-2,5458333	,8734518	,075	-5,342933	,251267
Tamaño de poro	uc	mc	-28,5666667	160,065563	,998	-541,15294	484,019610
		uch	12,0333333	160,065563	1,000	-500,55294	524,619610
		mch	-40,1000000	160,065563	,994	-552,68628	472,486276
	mc	uc	28,5666667	160,065563	,998	-484,01961	541,152943
		uch	40,6000000	160,065563	,994	-471,98628	553,186276
		mch	-11,5333333	160,065563	1,000	-524,11961	501,052943
	uch	uc	-12,0333333	160,065563	1,000	-524,61961	500,552943
		mc	-40,6000000	160,065563	,994	-553,18628	471,986276
		mch	-52,1333333	160,065563	,987	-564,71961	460,452943
	mch	uc	40,1000000	160,065563	,994	-472,48628	552,686276
		mc	11,5333333	160,065563	1,000	-501,05294	524,119610
		uch	52,1333333	160,065563	,987	-460,45294	564,719610



## 8.2 Anexo 2: Análisis Estadístico para Pruebas Mecánicas

### Pruebas de normalidad

soporte	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Elongación max	UC	,238	3	,976	3	,701
	MC	,289	3	,927	3	,479
	UCH	,332	3	,863	3	,275
	MCH	,250	3	,967	3	,651
M. Young	UC	,306	3	,905	3	,400
	MC	,323	3	,879	3	,322
	UCH	,310	3	,899	3	,382
	MCH	,177	3	1,000	3	,964

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Elongación max	Se basa en la media	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Elongación max	Se basa en la media	4,658	3	8	,036
	Se basa en la mediana	2,181	3	8	,168
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,181	3	2,382	,302
	Se basa en la media recortada	4,465	3	8	,040
	M. Young	Se basa en la media	3,705	3	8
M. Young	Se basa en la mediana	,663	3	8	,598
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,663	3	3,813	,619
	Se basa en la media recortada	3,310	3	8	,078

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(i) soporte	(j) soporte	Diferencia de medias (i-j)	Dev. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Elongación max	UC	MC	,2609333 <sup>*</sup>	,0293521	,000	,166938	,354929
		UCH	,2888333 <sup>*</sup>	,0293521	,000	,194838	,382829
		MCH	,4125000 <sup>*</sup>	,0293521	,000	,318504	,506496
	MC	UC	-,2609333	,0293521	,000	-,354929	-,166938
		UCH	-,0279000	,0293521	,780	-,066096	,121896
		MCH	-,1515667 <sup>*</sup>	,0293521	,004	-,057571	-,245562
	UCH	UC	-,2888333 <sup>*</sup>	,0293521	,000	-,382829	-,194838
		MC	-,0279000	,0293521	,780	-,121896	,066096
		MCH	-,1236667 <sup>*</sup>	,0293521	,013	-,029671	-,217662
	MCH	UC	-,4125000 <sup>*</sup>	,0293521	,000	-,506496	-,318504
		MC	-,1515667 <sup>*</sup>	,0293521	,004	-,245562	-,057571
		UCH	-,1236667 <sup>*</sup>	,0293521	,013	-,217662	-,029671
M. Young	UC	MC	6,1960900 <sup>*</sup>	,7656734	,000	3,744134	8,648046
		UCH	3,6491100 <sup>*</sup>	,7656734	,006	1,197154	6,101066
		MCH	8,6952700 <sup>*</sup>	,7656734	,000	6,243314	11,147226
	MC	UC	-,6196090 <sup>*</sup>	,7656734	,000	-,8,648046	-,3,744134
		UCH	-,2,546980 <sup>*</sup>	,7656734	,042	-,4,998936	-,095024
		MCH	2,4991800 <sup>*</sup>	,7656734	,046	,047224	4,951136
	UCH	UC	-,3,649110 <sup>*</sup>	,7656734	,006	-,6,101066	-,1,197154
		MC	2,5469800 <sup>*</sup>	,7656734	,042	,095024	4,998936
		MCH	5,0461600 <sup>*</sup>	,7656734	,001	2,594204	7,498116
	MCH	UC	-,8,695270 <sup>*</sup>	,7656734	,000	-,11,147226	-,6,243314
		MC	-,2,499180 <sup>*</sup>	,7656734	,046	-,4,951136	-,047224
		UCH	-,5,046160 <sup>*</sup>	,7656734	,001	-,7,498116	-,2,594204

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Elongación max	Entre grupos	,271	3	,090	69,780	,000
	Dentro de grupos	,010	8	,001		
	Total	,281	11			
M. Young	Entre grupos	124,134	3	41,378	47,053	,000
	Dentro de grupos	7,035	8	,879		
	Total	131,169	11			

## 8.3 Anexo 3: Análisis Estadístico Para Absorción de Agua

### Pruebas de normalidad

Soporte	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Hinchamiento	uc	,143	48	,015	,951	48	,044
	mc	,106	48	,200 <sup>*</sup>	,969	48	,235
	uch	,100	48	,200 <sup>*</sup>	,987	48	,851
	mch	,067	48	,200 <sup>*</sup>	,981	48	,601

<sup>\*</sup>. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error<sup>a,b</sup>

Hinchamiento		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
		Se basa en la media	2,162	63	128
	Se basa en la mediana	,701	63	128	,942
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,701	63	50,245	,910
	Se basa en la media recortada	2,026	63	128	,000

Prueba la hipótesis nula de que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Variable dependiente: Hinchamiento

b. Diseño: Intersección + soporte + Tiempo + soporte \* Tiempo

## Pruebas post hoc

### Soporte

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Hinchamiento

HSD Tukey

(I) Soporte	(J) Soporte	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
uc	mc	3336,67 <sup>*</sup>	24,635	,000	3272,54	3400,79
	uch	5442,71 <sup>*</sup>	24,635	,000	5378,58	5506,84
	mch	5762,96 <sup>*</sup>	24,635	,000	5698,83	5827,09
mc	uc	-3336,67 <sup>*</sup>	24,635	,000	-3400,79	-3272,54
	uch	2106,04 <sup>*</sup>	24,635	,000	2041,91	2170,17
	mch	2426,29 <sup>*</sup>	24,635	,000	2362,16	2490,42
uch	uc	-5442,71 <sup>*</sup>	24,635	,000	-5506,84	-5378,58
	mc	-2106,04 <sup>*</sup>	24,635	,000	-2170,17	-2041,91
	mch	320,25 <sup>*</sup>	24,635	,000	256,12	384,38
mch	uc	-5762,96 <sup>*</sup>	24,635	,000	-5827,09	-5698,83
	mc	-2426,29 <sup>*</sup>	24,635	,000	-2490,42	-2362,16
	uch	-320,25 <sup>*</sup>	24,635	,000	-384,38	-256,12

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 14565,052.

<sup>\*</sup>. La diferencia de medias es significativa en el nivel

## 8.4 Anexo 4: Análisis Estadístico para Degradación

### Pruebas de normalidad

Soporte	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
degradación uc	,123	12	,200*	,976	12	,963
mc	,184	12	,200*	,933	12	,413
uch	,227	12	,088	,926	12	,339
mch	,186	12	,200*	,944	12	,550

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error<sup>a,b</sup>

degradación		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
		Se basa en la media	1,110	15	32
Se basa en la mediana	,232	15	32	,998	
Se basa en la mediana y con gl ajustado	,232	15	20,211	,997	
Se basa en la media recortada	1,007	15	32	,472	

Prueba la hipótesis nula de que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Variable dependiente: degradación

b. Diseño : Intersección + soporte + Tiempo + soporte \* Tiempo

## Pruebas post hoc

### Soporte

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: degradación

HSD Tukey

(I) Soporte	(J) Soporte	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
uc	mc	-,67	,507	,560	-2,04	,71
	uch	3,83*	,507	,000	2,46	5,21
	mch	2,25*	,507	,001	,88	3,62
mc	uc	,67	,507	,560	-,71	2,04
	uch	4,50*	,507	,000	3,13	5,87
	mch	2,92*	,507	,000	1,54	4,29
uch	uc	-3,83*	,507	,000	-5,21	-2,46
	mc	-4,50*	,507	,000	-5,87	-3,13
	mch	-1,58*	,507	,019	-2,96	-,21
mch	uc	-2,25*	,507	,001	-3,62	-,88
	mc	-2,92*	,507	,000	-4,29	-1,54
	uch	1,58*	,507	,019	,21	2,96

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 1,542.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel

## 8.5 Anexo 5: Análisis Estadístico para Reactividad Biológica

### Pruebas de normalidad

Soporte	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Viabilidad celular						
uc	,225	3	.	,984	3	,756
mc	,299	3	.	,915	3	,433
uch	,177	3	.	1,000	3	,973
mch	,236	3	.	,977	3	,712
silicona	,188	3	.	,998	3	,911
DMSO	,385	3	.	,750	3	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Viabilidad celular	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la mediana	1,207	5	12	,363
Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,207	5	7,241	,393
Se basa en la media recortada	1,500	5	12	,261

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Viabilidad celular  
HSD Tukey

(i) Soporte	(j) Soporte	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
uc	mc	16,333	10,630	,650	-19,37	52,04
	uch	5,000	10,630	,996	-30,71	40,71
	mch	16,000	10,630	,668	-19,71	51,71
	silicona	8,333	10,630	,965	-27,37	44,04
	DMSO	104,867	10,630	,000	69,16	140,57
mc	uc	-16,333	10,630	,650	-52,04	19,37
	uch	-11,333	10,630	,886	-47,04	24,37
	mch	-.333	10,630	1,000	-36,04	35,37
	silicona	-8,000	10,630	,971	-43,71	27,71
	DMSO	88,533	10,630	,000	52,83	124,24
uch	uc	-5,000	10,630	,996	-40,71	30,71
	mc	11,333	10,630	,886	-24,37	47,04
	mch	11,000	10,630	,897	-24,71	46,71
	silicona	3,333	10,630	,999	-32,37	39,04
	DMSO	99,867	10,630	,000	64,16	135,57
mch	uc	-16,000	10,630	,668	-51,71	19,71
	mc	-.333	10,630	1,000	-35,37	36,04
	uch	-11,000	10,630	,897	-46,71	24,71
	silicona	-7,667	10,630	,975	-43,37	28,04
	DMSO	88,867	10,630	,000	53,16	124,57
silicona	uc	-8,333	10,630	,965	-44,04	27,37
	mc	8,000	10,630	,971	-27,71	43,71
	uch	-3,333	10,630	,999	-39,04	32,37
	mch	7,667	10,630	,975	-28,04	43,37
	DMSO	96,533	10,630	,000	60,83	132,24
DMSO	uc	-104,867	10,630	,000	-140,57	-69,16
	mc	-88,533	10,630	,000	-124,24	-52,83
	uch	-99,867	10,630	,000	-135,57	-64,16
	mch	-88,867	10,630	,000	-124,57	-53,16
	silicona	-96,533	10,630	,000	-132,24	-60,83

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

### ANOVA

Viabilidad celular	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	23512,578	5	4702,516	27,743	,000
Dentro de grupos	2034,027	12	169,502		
Total	25546,604	17			



## 8.6 Anexo 6: Análisis Estadístico para Adhesión de rBM-MS

### Pruebas de normalidad

ADHESION	SOPORTE	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	H	,347	3	.	,834	3	,200
	UC	,223	3	.	,985	3	,765
	MC	,319	3	.	,885	3	,338
	UCH	,213	3	.	,990	3	,806
	MCH	,175	3	.	1,000	3	1,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

ADHESION		Estadístico de Levene			
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
	Se basa en la media	1,430	4	10	,294
	Se basa en la mediana	,254	4	10	,901
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,254	4	4,671	,895
	Se basa en la media recortada	1,296	4	10	,335

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: ADHESION

HSD Tukey

ANOVA					
ADHESION	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	27479153,6	4	6869788,40	1,528	,267
Dentro de grupos	44961254,0	10	4496125,40		
Total	72440407,6	14			

(i) SOPORTE	(j) SOPORTE	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
H	UC	2863,33333	1731,30498	,500	-2834,5336	8561,2002
	MC	-224,66667	1731,30498	1,000	-5922,5336	5473,2002
	UCH	-673,66667	1731,30498	,994	-6371,5336	5024,2002
	MCH	-842,00000	1731,30498	,987	-6539,8669	4855,8669
UC	H	-2863,33333	1731,30498	,500	-8561,2002	2834,5336
	MC	-3088,00000	1731,30498	,432	-8785,8669	2609,8669
	UCH	-3537,00000	1731,30498	,314	-9234,8669	2160,8669
	MCH	-3705,33333	1731,30498	,276	-9403,2002	1992,5336
MC	H	224,66667	1731,30498	1,000	-5473,2002	5922,5336
	UC	3088,00000	1731,30498	,432	-2609,8669	8785,8669
	UCH	-449,00000	1731,30498	,999	-6146,8669	5248,8669
	MCH	-617,33333	1731,30498	,996	-6315,2002	5080,5336
UCH	H	673,66667	1731,30498	,994	-5024,2002	6371,5336
	UC	3537,00000	1731,30498	,314	-2160,8669	9234,8669
	MC	449,00000	1731,30498	,999	-5248,8669	6146,8669
	MCH	-168,33333	1731,30498	1,000	-5866,2002	5529,5336
MCH	H	842,00000	1731,30498	,987	-4855,8669	6539,8669
	UC	3705,33333	1731,30498	,276	-1992,5336	9403,2002
	MC	617,33333	1731,30498	,996	-5080,5336	6315,2002
	UCH	168,33333	1731,30498	1,000	-5529,5336	5866,2002

## 8.7 Anexo 7: Análisis Estadístico para XTT y ALP FGF-2 de rBM-MSc en Monocapa

### XTT

#### Pruebas de normalidad

	FGF	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
NoCelulas	0	,179	12	,200*	,944	12	,546
	2	,148	12	,200*	,927	12	,347
	10	,192	12	,200*	,924	12	,325
	20	,220	12	,111	,887	12	,108

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

NoCelulas		Estadístico de Levene		Sig.
		gl1	gl2	
NoCelulas	Se basa en la media	5,707	3	,002
	Se basa en la mediana	4,784	3	,006
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4,784	3	,006
	Se basa en la media recortada	5,712	3	,002

### En BMP=0 ng/mL

#### ANOVA

NoCelulas	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	126430396	3	42143465,4	29,114	,0
Dentro de grupos	63690953,9	44	1447521,68		
Total	190121350	47			

#### Comparaciones múltiples

Variante dependiente: NoCelulas  
HSD Tukey

(I) FGF	(J) FGF	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	2	-3764,33*	308,430	,000	-4627,61	-2901,05
	10	-3025,50*	308,430	,000	-3888,78	-2162,22
	20	-1138,17*	308,430	,007	-2001,44	-274,90
2	0	3764,33*	308,430	,000	2901,06	4627,61
	10	738,83	308,430	,110	-124,44	1602,34
	20	2626,17*	308,430	,000	1762,89	3489,45
10	0	3025,50*	308,430	,000	2162,22	3888,78
	2	-738,83	308,430	,110	-1602,11	124,44
	20	1887,33*	308,430	,000	1024,06	2750,61
20	0	1138,17*	308,430	,007	274,89	2001,44
	2	-2626,17*	308,430	,000	-3489,44	-1762,22
	10	-1887,33*	308,430	,000	-2750,61	-1024,06

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 285386,650.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0

### En BMP=200 ng/mL

#### Pruebas post hoc

#### FGF

#### Comparaciones múltiples

Variante dependiente: NoCelulas  
HSD Tukey

(I) FGF	(J) FGF	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	2	-4872,83*	364,274	,000	-5892,41	-3853,25
	10	-3729,50*	364,274	,000	-4749,08	-2709,92
	20	-2905,83*	364,274	,000	-3925,41	-1886,25
2	0	4872,83*	364,274	,000	3853,25	5892,41
	10	1143,33*	364,274	,025	123,75	2162,92
	20	1967,00*	364,274	,000	947,42	2986,58
10	0	3729,50*	364,274	,000	2709,92	4749,08
	2	-1143,33*	364,274	,025	-2162,91	-123,75
	20	823,67	364,274	,141	-195,91	1843,25
20	0	2905,83*	364,274	,000	1886,25	3925,41
	2	-1967,00*	364,274	,000	-2986,58	-947,41
	10	-823,67	364,274	,141	-1843,25	195,92

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 398087,158.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0

# ALP

## Pruebas de normalidad

	FGF	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
NoCelulas	0	,209	12	,155	,906	12	,1
	2	,264	12	,021	,818	12	,0
	10	,140	12	,200 <sup>*</sup>	,957	12	,7
	20	,187	12	,200 <sup>*</sup>	,893	12	,1

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.  
a. Corrección de significación de Lilliefors

Distribución: normal + FCF + BMP + FCF + BMP  
a. Variable dependiente: NoCelulas

Estadísticos:

Prueba	Estadístico	gl	Sig.
Prueba de normalidad	0,209	12	,155
Prueba de normalidad	0,264	12	,021
Prueba de normalidad	0,140	12	,200 <sup>*</sup>
Prueba de normalidad	0,187	12	,200 <sup>*</sup>

Pruebas de normalidad de Lilliefors de variables de error de normalidad

## En BMP=0 ng/mL

### Pruebas post hoc

#### FGF

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: NoCelulas  
HSD Tukey

(i) FGF	(j) FGF	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	2	,00024550 <sup>*</sup>	,000012447	,000	,00021066	,00028034
	10	,00032750 <sup>*</sup>	,000012447	,000	,00029266	,00036234
	20	,00035283 <sup>*</sup>	,000012447	,000	,00031799	,00038767
2	0	-,0002455 <sup>*</sup>	,000012447	,000	-,00028034	-,00021066
	10	,00008200 <sup>*</sup>	,000012447	,000	,00004716	,00011684
	20	,00010733 <sup>*</sup>	,000012447	,000	,00007249	,00014217
10	0	-,0003275 <sup>*</sup>	,000012447	,000	-,00036234	-,00029266
	2	-,0000820 <sup>*</sup>	,000012447	,000	-,00011684	-,00004716
	20	-,00002533	,000012447	,209	-,00000951	,00006017
20	0	-,0003528 <sup>*</sup>	,000012447	,000	-,00038767	-,00031799
	2	-,0001073 <sup>*</sup>	,000012447	,000	-,00014217	-,00007249
	10	-,00002533	,000012447	,209	-,00006017	,00000951

Se basa en las medias observadas.  
El término de error es la media cuadrática(Error) = 4,648E-10.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel

## En BMP=200 ng/mL

### Pruebas post hoc

#### FGF

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: NoCelulas  
HSD Tukey

(i) FGF	(j) FGF	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	2	,00016700 <sup>*</sup>	,000018240	,000	,00011595	,00021805
	10	,00042333 <sup>*</sup>	,000018240	,000	,00037228	,00047438
	20	,00043133 <sup>*</sup>	,000018240	,000	,00038028	,00048238
2	0	-,0001670 <sup>*</sup>	,000018240	,000	-,00021805	-,00011595
	10	,00025633 <sup>*</sup>	,000018240	,000	,00020528	,00030738
	20	,00026433 <sup>*</sup>	,000018240	,000	,00021328	,00031538
10	0	-,0004233 <sup>*</sup>	,000018240	,000	-,00047439	-,00037228
	2	-,0002563 <sup>*</sup>	,000018240	,000	-,00030739	-,00020528
	20	,00000800	,000018240	,971	-,00004305	,00000595
20	0	-,0004313 <sup>*</sup>	,000018240	,000	-,00048239	-,00038028
	2	-,0002643 <sup>*</sup>	,000018240	,000	-,00031539	-,00021805
	10	-,00000800	,000018240	,971	-,00005905	,00000405

Se basa en las medias observadas.  
El término de error es la media cuadrática(Error) = 9,981E-10.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel



## 8.8 Anexo 8: Análisis Estadístico para XTT y ALP VEGF de rBM-MSK en Monocapa

Pruebas de normalidad							
	FGF	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
NoCélulas	0	,235	12	,065	,852	12	,039
	2	,180	12	,200 <sup>*</sup>	,916	12	,257
	10	,229	12	,083	,822	12	,017
	20	,247	12	,041	,869	12	,064

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas						
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
NoCélulas	Se basa en la media	3,613	3	44	,020	
	Se basa en la mediana	2,106	3	44	,113	
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,106	3	26,268	,124	
	Se basa en la media recortada	3,620	3	44	,020	

### En BMP-2=0 ng/mL

### En BMP-2=200 ng/mL

#### Pruebas post hoc

#### FGF

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: NoCélulas

HSD Tukey

(I) FGF	(J) FGF	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	2	4,83333333	314,468644	1,000	-875,34434	885,011009
	10	-793,00000	314,468644	,087	-1673,1777	87,1776762
	20	473,166667	314,468644	,453	-407,01101	1353,34434
2	0	-4,83333333	314,468644	1,000	-885,01101	875,344343
	10	-797,83333	314,468644	,084	-1678,0110	82,3443428
	20	468,333333	314,468644	,462	-411,84434	1348,51101
10	0	793,000000	314,468644	,087	-87,177676	1673,17768
	2	797,833333	314,468644	,084	-82,344343	1678,01101
	20	1266,1667 <sup>*</sup>	314,468644	,003	385,988991	2146,34434
20	0	-473,16667	314,468644	,453	-1353,3443	407,011009
	2	-468,33333	314,468644	,462	-1348,5110	411,844343
	10	-1266,167 <sup>*</sup>	314,468644	,003	-2146,3443	-385,98899

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 296671,583.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: NoCélulas

HSD Tukey

(I) FGF	(J) FGF	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	2	2012,9167 <sup>*</sup>	218,940232	,000	1426,06504	2599,76830
	10	1761,7500 <sup>*</sup>	218,940232	,000	1174,89837	2348,60163
	20	2555,0000 <sup>*</sup>	218,940232	,000	1968,14837	3141,85163
2	0	-2012,917 <sup>*</sup>	218,940232	,000	-2599,7683	-1426,0650
	10	-251,16667	218,940232	,663	-838,01830	335,684962
	20	542,083333	218,940232	,079	-44,768295	1128,93496
10	0	-1761,750 <sup>*</sup>	218,940232	,000	-2348,6016	-1174,8984
	2	251,166667	218,940232	,663	-335,68496	838,018295
	20	793,25000 <sup>*</sup>	218,940232	,004	206,398371	1380,10163
20	0	-2555,000 <sup>*</sup>	218,940232	,000	-3141,8516	-1968,1484
	2	-542,08333	218,940232	,079	-1128,9350	44,7682954
	10	-793,2500 <sup>*</sup>	218,940232	,004	-1380,1016	-206,39837

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 287608,950.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel



## 8.9 Anexo 9: Análisis Estadístico para ALP VEGF – 2D de rBM-MSc en Monocapa

Pruebas de normalidad							
	FGF	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
NoCelulas	0	,312	12	,002	,723	12	,001
	2	,319	12	,001	,735	12	,002
	10	,297	12	,004	,734	12	,002
	20	,305	12	,003	,741	12	,002

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl		Sig.
			gl1	gl2	
NoCelulas	Se basa en la media	11,393	3	44	,000
	Se basa en la mediana	7,828	3	44	,000
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	7,828	3	33,124	,000
	Se basa en la media recortada	11,323	3	44	,000

### En BMP-2=0 ng/mL

### En BMP-2=200 ng/mL

#### Pruebas post hoc

#### FGF

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: NoCelulas

HSD Tukey

(I) FGF	(J) FGF	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	2	,00009067*	,000013667	,000	,00005241	,00012892
	10	,00011567*	,000013667	,000	,00007741	,00015392
	20	,00009067*	,000013667	,000	,00005241	,00012892
	2	-,0000907*	,000013667	,000	-,00012892	-,00005241
2	10	,00002500	,000013667	,289	-,00001325	,00006325
	20	,00000000	,000013667	1,000	-,00003825	,00003825
	0	-,0001157*	,000013667	,000	-,00015392	-,00007741
	2	-,00002500	,000013667	,289	-,00006325	,00001325
10	20	-,00002500	,000013667	,289	-,00006325	,00001325
	0	-,0000907*	,000013667	,000	-,00012892	-,00005241
	2	,00000000	,000013667	1,000	-,00003825	,00003825
	10	,00002500	,000013667	,289	-,00001325	,00006325

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 5,604E-10.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0

#### Pruebas post hoc

#### FGF

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: NoCelulas

HSD Tukey

(I) FGF	(J) FGF	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	2	,00000583	,000034730	,998	-,00009137	,00010304
	10	,00005417	,000034730	,423	-,00004304	,00015137
	20	-,0001122*	,000034730	,020	-,00020937	-,00001496
2	0	-,00000583	,000034730	,998	-,00010304	,00009137
	10	,00004833	,000034730	,519	-,00004887	,00014554
	20	-,0001180*	,000034730	,014	-,00021521	-,00002079
10	0	-,00005417	,000034730	,423	-,00015137	,00004304
	2	-,00004833	,000034730	,519	-,00014554	,00004887
	20	-,0001663*	,000034730	,001	-,00026354	-,00006913
20	0	,00011217*	,000034730	,020	,00001496	,00020937
	2	,00011800*	,000034730	,014	,00002079	,00021521
	10	,00016633*	,000034730	,001	,00006913	,00026354

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 3,618E-9.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0

## 8.10 Anexo 10: Análisis Estadístico para ug DNA 3D: Comparación Dentro de Grupos UC, MC y H

### Pruebas de normalidad

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
uc	c	,219	4	,940	4	,652
	b	,234	4	,903	4	,445
	v	,289	4	,867	4	,285
	f	,199	4	,965	4	,808
	bv	,184	4	,976	4	,876
	bf	,185	4	,987	4	,940
mc	c	,295	4	,847	4	,216
	b	,293	4	,861	4	,264
	v	,214	4	,982	4	,913
	f	,233	4	,932	4	,607
	bv	,253	4	,921	4	,545
	bf	,359	4	,794	4	,092
h	c	,189	4	,970	4	,841
	b	,316	4	,782	4	,073
	v	,297	4	,820	4	,144
	f	,228	4	,950	4	,714
	bv	,166	4	,991	4	,960
	bf	,257	4	,919	4	,529

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene			Sig.
		gl1	gl2		
uc	Se basa en la media	,547	5	30	,739
	Se basa en la mediana	,502	5	30	,772
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,502	5	23,407	,772
	Se basa en la media recortada	,531	5	30	,751
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,531	5	23,407	,751
mc	Se basa en la media	,766	5	30	,581
	Se basa en la mediana	,680	5	30	,642
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,680	5	24,263	,643
	Se basa en la media recortada	,766	5	30	,581
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,766	5	24,263	,643
h	Se basa en la media	6,469	5	18	,001
	Se basa en la mediana	4,304	5	18	,009
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4,304	5	8,721	,030
	Se basa en la media recortada	6,469	5	18	,001
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	6,469	5	8,721	,030

### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
uc	Entre grupos	1538,960	5	307,792	3,537	,012
	Dentro de grupos	2610,750	30	87,025		
	Total	4149,710	35			
mc	Entre grupos	426,026	5	85,205	1,371	,263
	Dentro de grupos	1864,999	30	62,167		
	Total	2291,024	35			
h	Entre grupos	2163,562	5	432,712	4,044	,012
	Dentro de grupos	1926,056	18	107,003		
	Total	4089,618	23			

### Comparaciones múltiples

HSD Tukey

Variable dependiente	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
uc	c	b	-13,76233	5,38594	,140	-30,1442	2,6195
		v	4,18050	5,38594	,969	-12,2013	20,5623
		f	-5,85067	5,38594	,863	-22,2325	10,5312
		bv	-11,56300	5,38594	,292	-27,9448	4,8188
		bf	-11,13667	5,38594	,330	-27,5185	5,2452
		bv	13,76233	5,38594	,140	-2,6195	30,1442
	b	v	17,94283	5,38594	,025	1,5610	34,3247
		f	7,91167	5,38594	,686	-8,4702	24,2935
		bv	2,19933	5,38594	,998	-14,1825	18,5812
		bf	2,82567	5,38594	,996	-13,7562	19,0075
		v	-4,18050	5,38594	,969	-20,5623	12,2013
		c	-17,94283	5,38594	,025	-34,3247	-1,5610
	v	f	-10,03117	5,38594	,444	-26,4130	6,3507
		bv	-15,74350	5,38594	,065	-32,1253	,6383
		bf	-15,31717	5,38594	,077	-31,6990	1,0647
		c	5,85067	5,38594	,863	-10,5312	22,2325
		b	-7,91167	5,38594	,686	-24,2935	8,4702
		v	10,03117	5,38594	,444	-6,3507	26,4130
	f	bv	-5,71233	5,38594	,893	-22,0942	10,6695
		bf	-5,28600	5,38594	,920	-21,6678	11,0958
		bv	11,56300	5,38594	,292	-4,8188	27,9448
		c	-2,19933	5,38594	,998	-18,5812	14,1825
		v	15,74350	5,38594	,065	-6,3833	32,1253
		f	5,71233	5,38594	,893	-10,6695	22,0942
bf	c	-4,26333	5,38594	1,000	-15,9555	16,8082	
	b	11,13667	5,38594	,330	-5,2452	27,5185	
	v	-2,82567	5,38594	,996	-19,0075	13,7562	
	b	15,31717	5,38594	,077	-1,0647	31,6990	
	f	5,28600	5,38594	,920	-11,0958	21,6678	
	bf	-4,26333	5,38594	1,000	-16,8082	15,9555	
mc	c	b	-3,17133	4,55217	,981	-17,0172	10,6745
		v	3,89583	4,55217	,963	-10,1500	17,5417
		f	6,26433	4,55217	,740	-7,5815	20,1102
		bv	-3,24183	4,55217	,979	-17,0877	10,6040
		bf	-4,5817	4,55217	1,000	-13,3877	14,3040
		b	3,17133	4,55217	,981	-10,6745	17,0172
	b	v	6,86717	4,55217	,662	-6,9787	20,7130
		f	9,43567	4,55217	,328	-4,4102	23,2815
		bv	-0,7050	4,55217	1,000	-13,9163	13,7753

h	c	bf	3,62950	4,55217	,966	-10,2163	17,4753
		c	-3,89583	4,55217	,963	-17,5417	10,1500
		b	-6,86717	4,55217	,662	-20,7130	6,9787
		f	2,56850	4,55217	,993	-11,2773	16,4143
		bv	-6,93767	4,55217	,652	-20,7835	6,9082
		bf	-3,23767	4,55217	,979	-17,0835	10,6082
	f	c	-6,26433	4,55217	,740	-20,1102	7,5815
		b	-9,43567	4,55217	,328	-23,2815	4,4102
		v	-2,56850	4,55217	,993	-16,4143	11,2773
		bv	-9,50617	4,55217	,320	-23,3520	4,3397
		bf	-5,80617	4,55217	,796	-19,6520	8,0397
		bf	3,24183	4,55217	,979	-10,6040	17,0877
bv	c	-0,7050	4,55217	1,000	-13,7753	13,9163	
	v	6,93767	4,55217	,652	-6,9082	20,7835	
	f	9,50617	4,55217	,320	-4,3397	23,3520	
	bf	3,70000	4,55217	,983	-10,1458	17,5458	
	c	-4,5817	4,55217	1,000	-14,3040	13,3877	
	b	-3,62950	4,55217	,966	-17,4753	10,2163	
b	v	3,23767	4,55217	,979	-10,6082	17,0835	
	f	5,80617	4,55217	,796	-8,0397	19,6520	
	bv	-3,70000	4,55217	,983	-17,5458	10,1458	
	c	-15,41175	7,31448	,327	-38,6574	7,8339	
	v	10,82250	7,31448	,681	-12,4232	34,0682	
	bf	13,03900	7,31448	,500	-10,2067	36,2847	
f	bv	-3,96075	7,31448	,994	-27,2064	19,2849	
	bf	-1,44375	7,31448	1,000	-24,6894	21,8019	
	c	15,41175	7,31448	,327	-7,8339	38,6574	
	v	26,23425	7,31448	,022	2,9886	49,4799	
	f	28,45075	7,31448	,012	5,2051	51,6964	
	bf	11,45100	7,31448	,630	-11,7947	34,6967	
v	c	13,96800	7,31448	,428	-9,2777	37,2137	
	bf	-10,82250	7,31448	,681	-34,0682	12,4232	
	b	-26,23425	7,31448	,022	-49,4799	-2,9886	
	f	2,21650	7,31448	1,000	-21,0292	25,4622	
	bv	-14,78325	7,31448	,369	-38,0289	8,4624	
	bf	-12,26625	7,31448	,563	-35,5119	10,9794	
f	c	-13,03900	7,31448	,500	-36,2847	10,2067	
	b	-28,45075	7,31448	,012	-51,6964	-5,2051	
	v	-2,21650	7,31448	1,000	-25,4622	21,0292	
	bv	-16,99975	7,31448	,235	-40,2454	6,2459	
	bf	-14,48275	7,31448	,390	-37,7284	8,7629	
	c	3,96075	7,31448	,994	-19,2849	27,2064	
bv	b	-11,45100	7,31448	,630	-34,6967	11,7947	
	v	14,78325	7,31448	,369	-8,4624	38,0289	
	f	16,99975	7,31448	,235	-6,2459	40,2454	
	bf	2,51700	7,31448	,999	-20,7287	25,7627	

bf	c	1,44375	7,31448	1,000	-21,8019	24,6894
	b	-13,96800	7,31448	,428	-37,2137	9,2777
	v	12,26625	7,31448	,563	-10,9794	35,5119
	f	14,48275	7,31448	,390	-8,7629	37,7284
	bv	-2,51700	7,31448	,999	-20,7287	25,7627

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.



## Comparación entre Grupos UC, MC y H

±

### Comparaciones múltiples

HSD Tukey

Variable dependiente	(I) soporte	(J) soporte	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
c	uc	mc	-13,04400*	4,55072	,033	-25,0599	-1,0281
		h	-20,04258*	5,08786	,004	-33,4768	-6,6084
	mc	uc	13,04400*	4,55072	,033	1,0281	25,0599
		h	-6,99858	5,08786	,381	-20,4328	6,4356
	h	uc	20,04258*	5,08786	,004	6,6084	33,4768
		mc	6,99858	5,08786	,381	-6,4356	20,4328
b	uc	mc	-2,45300	4,28669	,837	-13,7717	8,8657
		h	-21,69200*	4,79266	,002	-34,3467	-9,0373
	mc	uc	2,45300	4,28669	,837	-8,8657	13,7717
		h	-19,23900*	4,79266	,004	-31,8937	-6,5843
	h	uc	21,69200*	4,79266	,002	9,0373	34,3467
		mc	19,23900*	4,79266	,004	6,5843	31,8937
v	uc	mc	-13,52867	6,10572	,106	-29,6504	2,5931
		h	-13,40058	6,82640	,161	-31,4253	4,6241
	mc	uc	13,52867	6,10572	,106	-2,5931	29,6504
		h	,12808	6,82640	1,000	-17,8966	18,1528
	h	uc	13,40058	6,82640	,161	-4,6241	31,4253
		mc	-,12808	6,82640	1,000	-18,1528	17,8966
f	uc	mc	-,92900	4,94755	,981	-13,9927	12,1347
		h	-1,15292	5,53152	,976	-15,7586	13,4527
	mc	uc	,92900	4,94755	,981	-12,1347	13,9927
		h	-,22392	5,53152	,999	-14,8296	14,3817
	h	uc	1,15292	5,53152	,976	-13,4527	15,7586
		mc	,22392	5,53152	,999	-14,3817	14,8296
bv	uc	mc	-4,72283	6,30898	,740	-21,3813	11,9356
		h	-12,44033	7,05365	,220	-31,0651	6,1844
	mc	uc	4,72283	6,30898	,740	-11,9356	21,3813
		h	-7,71750	7,05365	,534	-26,3422	10,9072
	h	uc	12,44033	7,05365	,220	-6,1844	31,0651
		mc	7,71750	7,05365	,534	-10,9072	26,3422
bf	uc	mc	-1,44917	4,84797	,952	-14,2499	11,3516
		h	-10,34967	5,42020	,175	-24,6614	3,9620
	mc	uc	1,44917	4,84797	,952	-11,3516	14,2499
		h	-8,90050	5,42020	,264	-23,2122	5,4112
	h	uc	10,34967	5,42020	,175	-3,9620	24,6614
		mc	8,90050	5,42020	,264	-5,4112	23,2122

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## 8.11 Anexo 11: Análisis Estadístico para ALP 3D: Comparación Entre Grupos UC, MC y H

Pruebas de normalidad							
Soporte	Estadístico	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		Shapiro-Wilk		Sig.	
		gl	Sig.	Estadístico	gl		
c	uc	,267	6	,200 <sup>*</sup>	,873	6	,237
	mc	,217	6	,200 <sup>*</sup>	,865	6	,206
	h	,253	4	.	,895	4	,408
bmp2	uc	,167	6	,200 <sup>*</sup>	,974	6	,920
	mc	,214	6	,200 <sup>*</sup>	,943	6	,682
	h	,222	4	.	,910	4	,483
vegf	uc	,222	6	,200 <sup>*</sup>	,893	6	,336
	mc	,169	6	,200 <sup>*</sup>	,957	6	,795
	h	,375	4	.	,808	4	,117
fgf2	uc	,181	6	,200 <sup>*</sup>	,923	6	,529
	mc	,228	6	,200 <sup>*</sup>	,885	6	,292
	h	,152	4	.	,995	4	,981
bv	uc	,279	6	,159	,893	6	,335
	mc	,199	6	,200 <sup>*</sup>	,944	6	,690
	h	,150	4	.	,995	4	,983
bf	uc	,188	6	,200 <sup>*</sup>	,959	6	,810
	mc	,329	6	,041	,851	6	,161
	h	,244	4	.	,872	4	,307

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas					
c	Se basa en la media	Estadístico de Levene		gl'2	Sig.
		gl'1	gl'2		
c	Se basa en la media	3,823	2	13	,049
	Se basa en la mediana	2,661	2	13	,107
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,661	2	4,549	,172
	Se basa en la media recortada	3,661	2	13	,055
bmp2	Se basa en la media	,267	2	13	,770
	Se basa en la mediana	,295	2	13	,749
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,295	2	12,800	,749
	Se basa en la media recortada	,275	2	13	,764
vegf	Se basa en la media	,111	2	13	,896
	Se basa en la mediana	,046	2	13	,955
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,046	2	9,462	,955
	Se basa en la media recortada	,099	2	13	,906
fgf2	Se basa en la media	4,899	2	13	,026
	Se basa en la mediana	4,681	2	13	,029
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4,681	2	7,139	,050
	Se basa en la media recortada	4,887	2	13	,026
bv	Se basa en la media	6,518	2	13	,011
	Se basa en la mediana	6,113	2	13	,013
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	6,113	2	6,133	,035
	Se basa en la media recortada	6,464	2	13	,011
bf	Se basa en la media	3,587	2	13	,057
	Se basa en la mediana	2,370	2	13	,133
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,370	2	5,351	,183
	Se basa en la media recortada	3,552	2	13	,059

### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
UC	Entre grupos	20,917	3	6,972	3,486	,070
	Dentro de grupos	16,000	8	2,000		
	Total	36,917	11			
UCH	Entre grupos	146662,917	3	48887,639	10,913	,003
	Dentro de grupos	35837,333	8	4479,667		
	Total	182500,250	11			
MCH	Entre grupos	72514,000	3	24171,333	12,789	,002
	Dentro de grupos	15120,000	8	1890,000		
	Total	87634,000	11			
MC	Entre grupos	13,667	3	4,556	2,103	,178
	Dentro de grupos	17,333	8	2,167		
	Total	31,000	11			

Comparaciones múltiples

HSD Tukey

Variable dependiente	(i) DIA	(j) DIA	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
UC	0	7	-2,33333	1,15470	,257	-6,0311	1,3644
		14	-2,33333	1,15470	,257	-6,0311	1,3644
		28	-3,66667	1,15470	,052	-7,3644	,0311
	7	0	2,33333	1,15470	,257	-1,3644	6,0311
		14	,00000	1,15470	1,000	-3,6978	3,6978
		28	-1,33333	1,15470	,669	-5,0311	2,3644
	14	0	2,33333	1,15470	,257	-1,3644	6,0311
		7	,00000	1,15470	1,000	-3,6978	3,6978
		28	-1,33333	1,15470	,669	-5,0311	2,3644
	28	0	3,66667	1,15470	,052	-,0311	7,3644
		7	1,33333	1,15470	,669	-2,3644	5,0311
		14	1,33333	1,15470	,669	-2,3644	5,0311
UCH	0	7	4,33333	54,64837	1,000	-170,6700	179,3367
		14	-54,33333	54,64837	,757	-229,3367	120,6700
		28	-266,3333	54,64837	,005	-441,3367	-91,3300
	7	0	-4,33333	54,64837	1,000	-179,3367	170,6700
		14	-58,66667	54,64837	,714	-233,6700	116,3367
		28	-270,6667	54,64837	,005	-445,6700	-95,6633
	14	0	54,33333	54,64837	,757	-120,6700	229,3367
		7	58,66667	54,64837	,714	-116,3367	233,6700
		28	-212,0000	54,64837	,020	-387,0033	-36,9967
	28	0	266,33333	54,64837	,005	91,3300	441,3367
		7	270,66667	54,64837	,005	95,6633	445,6700
		14	212,00000	54,64837	,020	36,9967	387,0033
MCH	0	7	21,33333	35,49648	,929	-92,3389	135,0056
		14	-27,00000	35,49648	,870	-140,6722	86,6722
		28	-177,0000	35,49648	,005	-290,6722	-63,3278
	7	0	-21,33333	35,49648	,929	-135,0056	92,3389
		14	-48,33333	35,49648	,554	-162,0056	65,3389
		28	-198,3333	35,49648	,002	-312,0056	-84,6611
	14	0	27,00000	35,49648	,870	-86,6722	140,6722
		7	48,33333	35,49648	,554	-65,3389	162,0056
		28	-150,0000	35,49648	,012	-263,6722	-36,3278
	28	0	177,00000	35,49648	,005	63,3278	290,6722
		7	198,33333	35,49648	,002	84,6611	312,0056
		14	150,00000	35,49648	,012	36,3278	263,6722
MC	0	7	-2,33333	1,20185	,285	-6,1821	1,5154
		14	-1,00000	1,20185	,838	-4,8487	2,8487
		28	-2,66667	1,20185	,198	-6,5154	1,1821
	7	0	2,33333	1,20185	,285	-1,5154	6,1821
		14	1,33333	1,20185	,694	-2,5154	5,1821
		28	-,33333	1,20185	,992	-4,1821	3,5154
	14	0	1,00000	1,20185	,838	-2,8487	4,8487
		7	-1,33333	1,20185	,694	-5,1821	2,5154
		28	-1,66667	1,20185	,540	-5,5154	2,1821
	28	0	2,66667	1,20185	,198	-1,1821	6,5154
		7	,33333	1,20185	,992	-3,5154	4,1821
		14	1,66667	1,20185	,540	-2,1821	5,5154

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.



## 8.12 Anexo 12: Análisis Estadístico para Cuantificación de Calcio

### Pruebas de normalidad

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
uc						
c-	,260	2	.			
BMP2	,408	10	,000	,698	10	,001
BMP2/VEGF	,251	10	,074	,874	10	,112
mc						
c-	,260	2	.			
BMP2	,243	10	,096	,871	10	,102
BMP2/VEGF	,286	10	,020	,818	10	,024

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
uc	Se basa en la media	2,700	2	19	,093
	Se basa en la mediana	,712	2	19	,503
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,712	2	11,292	,511
	Se basa en la media recortada	1,869	2	19	,182
mc	Se basa en la media	4,630	2	19	,023
	Se basa en la mediana	4,367	2	19	,028
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4,367	2	16,119	,031
	Se basa en la media recortada	4,651	2	19	,023

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente	() tratamiento	() tratamiento	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Limite inferior	Limite superior	
uc	c-	BMP2	-35,49970 <sup>*</sup>	7,9830789	,001	-55,780313	-15,219087	
		BMP2/VEGF	-39,66110 <sup>*</sup>	7,9830789	,000	-59,941713	-19,380487	
	BMP2	c-	35,499700 <sup>*</sup>	7,9830789	,001	15,219087	55,780313	
		BMP2/VEGF	-4,1614000	4,6090327	,645	-15,870418	7,547618	
	BMP2/VEGF	c-	39,661100 <sup>*</sup>	7,9830789	,000	19,380487	59,941713	
		BMP2	4,1614000	4,6090327	,645	-7,547618	15,870418	
	mc	c-	BMP2	-18,596800	12,8783022	,339	-51,313484	14,119884
			BMP2/VEGF	-16,403300	12,8783022	,427	-49,119984	16,313384
BMP2		c-	18,5968000	12,8783022	,339	-14,119884	51,313484	
		BMP2/VEGF	2,1935000	7,4352913	,953	-16,695486	21,082486	
BMP2/VEGF		c-	16,4033000	12,8783022	,427	-16,313384	49,119984	
		BMP2	-2,1935000	7,4352913	,953	-21,082486	16,695486	

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
uc					
Entre grupos	2654,380	2	1327,190	12,495	,000
Dentro de grupos	2018,102	19	106,216		
Total	4672,482	21			
mc					
Entre grupos	580,879	2	290,439	1,051	,369
Dentro de grupos	5251,938	19	276,418		
Total	5832,816	21			

### Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
BMP-2	Se asumen varianzas iguales	,857	,368	2,065	17	,054	17,2204778	8,3379611	-3,710825	34,8120380
	No se asumen varianzas iguales			2,047	15,879	,058	17,2204778	8,4105251	-,6200444	35,0610000
BMP-2/VEGF	Se asumen varianzas iguales	23,980	,000	3,959	17	,001	22,4838222	5,6788432	10,5025103	34,4651341
	No se asumen varianzas iguales			3,788	9,658	,004	22,4838222	5,9361658	9,1935243	35,7741202

## 8.13 Anexo 13: Análisis Estadístico para Mineralización hWJ-MSc

### Medio de Crecimiento: Entre Grupos: 7, 14 y 28

#### Pruebas de normalidad

DIA	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
UC	0	,385	3	,750	3	,000
	7	,253	3	,964	3	,637
	14	,292	3	,923	3	,463
	28	,175	3	1,000	3	1,000
UCH	0	,321	3	,881	3	,328
	7	,319	3	,885	3	,339
	14	,362	3	,803	3	,122
	28	,289	3	,927	3	,477
MCH	0	,285	3	,932	3	,497
	7	,189	3	,998	3	,906
	14	,333	3	,861	3	,269
	28	,370	3	,786	3	,081
MC	0	,175	3	1,000	3	1,000
	7	,253	3	,964	3	,637
	14	,175	3	1,000	3	1,000
	28	,292	3	,923	3	,463

a. Corrección de significación de Lilliefors

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

Variable dependiente	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
					UC
	Se basa en la mediana	,556	3	8	,659
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,556	3	4,800	,668
	Se basa en la media recortada	1,745	3	8	,235
UCH	Se basa en la media	8,129	3	8	,008
	Se basa en la mediana	1,852	3	8	,216
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,852	3	2,238	,353
	Se basa en la media recortada	7,392	3	8	,011
MCH	Se basa en la media	9,455	3	8	,005
	Se basa en la mediana	,738	3	8	,559
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,738	3	2,233	,612
	Se basa en la media recortada	7,735	3	8	,009
MC	Se basa en la media	1,173	3	8	,379
	Se basa en la mediana	,306	3	8	,821
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,306	3	4,800	,821
	Se basa en la media recortada	1,093	3	8	,406

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(i) DIA	(j) DIA	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Limite inferior	Limite superior
UC	0	7	-2,33333	1,15470	,257	-6,0311	1,3644
		14	-2,33333	1,15470	,257	-6,0311	1,3644
		28	-3,66667	1,15470	,052	-7,3644	,0311
	7	0	2,33333	1,15470	,257	-1,3644	6,0311
		14	,00000	1,15470	1,000	-3,6978	3,6978
		28	-1,33333	1,15470	,669	-5,0311	2,3644
	14	0	2,33333	1,15470	,257	-1,3644	6,0311
		7	,00000	1,15470	1,000	-3,6978	3,6978
		28	-1,33333	1,15470	,669	-5,0311	2,3644
	28	0	3,66667	1,15470	,052	-.0311	7,3644
		7	1,33333	1,15470	,669	-2,3644	5,0311
		14	1,33333	1,15470	,669	-2,3644	5,0311
UCH	0	7	4,33333	54,64837	1,000	-170,6700	179,3367
		14	-54,33333	54,64837	,757	-229,3367	120,6700
		28	-266,3333	54,64837	,005	-441,3367	-91,3300
	7	0	-4,33333	54,64837	1,000	-179,3367	170,6700
		14	-58,66667	54,64837	,714	-233,6700	116,3367
		28	-270,6667	54,64837	,005	-445,6700	-95,6633
	14	0	54,33333	54,64837	,757	-120,6700	229,3367
		7	58,66667	54,64837	,714	-116,3367	233,6700
		28	-212,0000	54,64837	,020	-387,0033	-36,9967
	28	0	266,33333	54,64837	,005	91,3300	441,3367
		7	270,66667	54,64837	,005	95,6633	445,6700
		14	212,00000	54,64837	,020	36,9967	387,0033

#### ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
UC	Entre grupos	20,917	3	6,972	3,486
	Dentro de grupos	16,000	8	2,000	
	Total	36,917	11		
UCH	Entre grupos	146662,917	3	48887,639	10,913
	Dentro de grupos	35837,333	8	4479,667	
	Total	182500,250	11		
MCH	Entre grupos	72514,000	3	24171,333	12,789
	Dentro de grupos	15120,000	8	1890,000	
	Total	87634,000	11		
MC	Entre grupos	13,667	3	4,556	2,103
	Dentro de grupos	17,333	8	2,167	
	Total	31,000	11		

MCH	0	7	21,33333	35,49648	,929	-92,3389
		14	-27,00000	35,49648	,870	-140,6722
		28	-177,0000 <sup>a</sup>	35,49648	,005	-290,6722
	7	0	-21,33333	35,49648	,929	-135,0056
		14	-48,33333	35,49648	,554	-162,0056
		28	-198,3333 <sup>a</sup>	35,49648	,002	-312,0056
	14	0	27,00000	35,49648	,870	-86,6722
		7	48,33333	35,49648	,554	-65,3389
		28	-150,0000 <sup>a</sup>	35,49648	,012	-263,6722
	28	0	177,00000 <sup>a</sup>	35,49648	,005	63,3278
		7	198,33333 <sup>a</sup>	35,49648	,002	84,6611
		14	150,00000 <sup>a</sup>	35,49648	,012	36,3278
MC	0	7	-2,33333	1,20185	,285	-6,1821
		14	-1,00000	1,20185	,838	-4,8487
		28	-2,66667	1,20185	,198	-6,5154
	7	0	2,33333	1,20185	,285	-1,5154
		14	1,33333	1,20185	,694	-2,5154
		28	-,33333	1,20185	,992	-4,1821
	14	0	1,00000	1,20185	,838	-2,8487
		7	-1,33333	1,20185	,694	-5,1821
		28	-1,66667	1,20185	,540	-5,5154
	28	0	2,66667	1,20185	,198	-1,1821
		7	,33333	1,20185	,992	-3,5154
		14	1,66667	1,20185	,540	-2,1821

<sup>a</sup>. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## Medio de Crecimiento: Dentro de Grupos: 7, 14 y 28

### Pruebas de normalidad

DIA	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk	
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl
UC	0	,175	3	1,000	3
	7	,385	3	,750	3
	14	,385	3	,750	3
	28	,385	3	,750	3
UCH	0	,240	3	,975	3
	7	,219	3	,987	3
	14	,211	3	,991	3
	28	,211	3	,991	3
MCH	0	,285	3	,932	3
	7	,176	3	1,000	3
	14	,351	3	,827	3
	28	,189	3	,998	3
MC	0	,292	3	,923	3
	7	,196	3	,996	3
	14	,247	3	,969	3
	28	,182	3	,999	3

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
UC	Se basa en la media	,333	3	8	,802
	Se basa en la mediana	,250	3	8	,859
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,250	3	8,000	,859
	Se basa en la media recortada	,333	3	8	,802
UCH	Se basa en la media	2,076	3	8	,182
	Se basa en la mediana	1,367	3	8	,321
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,367	3	3,483	,386
	Se basa en la media recortada	2,030	3	8	,188
MCH	Se basa en la media	2,709	3	8	,115
	Se basa en la mediana	1,605	3	8	,263
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,605	3	4,021	,321
	Se basa en la media recortada	2,642	3	8	,121
MC	Se basa en la media	2,225	3	8	,163
	Se basa en la mediana	1,166	3	8	,381
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,166	3	3,823	,430
	Se basa en la media recortada	2,149	3	8	,172

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(i) DIA	(j) DIA	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%			
						Límite inferior	Límite superior		
UC	0	7	-.33333	,57735	,936	-2,1822	1,5155		
		14	-.33333	,57735	,936	-2,1822	1,5155		
		28	-1,66667	,57735	,078	-3,5155	,1822		
		7	0	,33333	,57735	,936	-1,5155	2,1822	
	7	0	,00000	,57735	1,000	-1,8489	1,8489		
		14	-1,33333	,57735	,175	-3,1822	,5155		
		28	0,00000	,57735	,936	-1,5155	2,1822		
		14	0	,00000	,57735	1,000	-1,8489	1,8489	
	14	0	-1,33333	,57735	,175	-3,1822	,5155		
		7	0,00000	,57735	,936	-1,5155	2,1822		
		28	-1,33333	,57735	,175	-3,1822	,5155		
		28	0	1,66667	,57735	,078	-.1822	3,5155	
	28	0	1,33333	,57735	,175	-.5155	3,1822		
		7	1,33333	,57735	,175	-.5155	3,1822		
		14	1,33333	,57735	,175	-.5155	3,1822		
		7	22,33333	24,06357	,791	54,7267	99,3934		
	UCH	0	14	-115,00000	24,06357	,006	-192,0600	-37,9400	
			28	-301,00000	24,06357	,000	-378,0600	-223,9400	
			7	0	-22,33333	24,06357	,791	-99,3934	54,7267
			14	-137,33333	24,06357	,002	-214,3934	-60,2733	
		7	0	-323,33333	24,06357	,000	-400,3934	-246,2733	
			14	0	115,00000	24,06357	,006	37,9400	192,0600
			28	137,33333	24,06357	,002	60,2733	214,3934	
			28	-186,00000	24,06357	,000	-263,0600	-108,9400	
		MCH	0	7	-27,33333	70,76997	,979	-253,9637	199,2970
				14	-182,00000	70,76997	,122	-408,6304	44,6304
				28	-507,00000	70,76997	,000	-733,6304	-280,3696
				7	0	27,33333	70,76997	,979	-199,2970
7	0		-154,66667	70,76997	,207	-381,2970	71,9637		
	14		-479,66667	70,76997	,001	-706,2970	-253,0363		
	28		182,00000	70,76997	,122	-44,6304	408,6304		
	28		154,66667	70,76997	,207	-71,9637	381,2970		
14	0		-325,00000	70,76997	,008	-551,6304	-98,3696		
	7		507,00000	70,76997	,000	280,3696	733,6304		
	28		479,66667	70,76997	,001	253,0363	706,2970		
	14		325,00000	70,76997	,008	98,3696	551,6304		
MC	0	7	-4,00000	6,72475	,931	-25,5350	17,5350		
		14	-76,00000	6,72475	,000	-97,5350	-54,4650		
		28	-162,66667	6,72475	,000	-184,2017	-141,1317		
		7	0	4,00000	6,72475	,931	-17,5350	25,5350	
	7	0	-72,00000	6,72475	,000	-93,5350	-50,4650		
		14	-158,66667	6,72475	,000	-180,2017	-137,1317		
		28	76,00000	6,72475	,000	54,4650	97,5350		
		14	0	72,00000	6,72475	,000	50,4650	93,5350	
	14	0	-86,66667	6,72475	,000	-108,2017	-65,1317		
		7	162,66667	6,72475	,000	141,1317	184,2017		
		28	158,66667	6,72475	,000	137,1317	180,2017		
		28	86,66667	6,72475	,000	65,1317	108,2017		

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
UC	Entre grupos	4,917	3	1,639	3,278	,080
	Dentro de grupos	4,000	8	,500		
	Total	8,917	11			
UCH	Entre grupos	196744,250	3	65581,417	75,504	,000
	Dentro de grupos	6948,667	8	868,583		
	Total	203692,917	11			
MCH	Entre grupos	487910,250	3	162636,750	21,649	,000
	Dentro de grupos	60100,667	8	7512,583		
	Total	548010,917	11			
MC	Entre grupos	52592,000	3	17530,667	258,437	,000
	Dentro de grupos	542,667	8	67,833		
	Total	53134,667	11			



ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dia7	Entre grupos	15594,917	3	5198,306	54,149	,000
	Dentro de grupos	768,000	8	96,000		
	Total	16362,917	11			
dia14	Entre grupos	48192,667	3	16064,222	73,802	,000
	Dentro de grupos	1741,333	8	217,667		
	Total	49934,000	11			
dia28	Entre grupos	288744,917	3	96248,306	15,945	,001
	Dentro de grupos	48289,333	8	6036,167		
	Total	337034,250	11			

Comparaciones múltiples									
HSD Tukey									
Variable dependiente	(i) soporte	(j) soporte	Diferencia de medias (i-j)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%			
						Límite inferior	Límite superior		
dia7	uc	mc	-.66667	8,00000	1,000	-26,2855	24,9521		
		uch	-79,66667 <sup>*</sup>	8,00000	,000	-105,2855	-54,0479		
		mch	-63,33333 <sup>*</sup>	8,00000	,000	-88,9521	-37,7145		
	mc	uc	,66667	8,00000	1,000	-24,9521	26,2855		
		uch	-79,00000 <sup>*</sup>	8,00000	,000	-104,6188	-53,3812		
		mch	-62,66667 <sup>*</sup>	8,00000	,000	-88,2855	-37,0479		
	uch	uc	79,66667 <sup>*</sup>	8,00000	,000	54,0479	105,2855		
		mc	79,00000 <sup>*</sup>	8,00000	,000	53,3812	104,6188		
		mch	16,33333	8,00000	,250	-9,2855	41,9521		
	mch	uc	63,33333 <sup>*</sup>	8,00000	,000	37,7145	88,9521		
		mc	62,66667 <sup>*</sup>	8,00000	,000	37,0479	88,2855		
		uch	-16,33333	8,00000	,250	-41,9521	9,2855		
	dia14	uc	mc	,66667	12,04621	1,000	-37,9095	39,2429	
			uch	-138,3333 <sup>*</sup>	12,04621	,000	-176,9095	-99,7571	
			mch	-111,6667 <sup>*</sup>	12,04621	,000	-150,2429	-73,0905	
mc		uc	-.66667	12,04621	1,000	-39,2429	37,9095		
		uch	-139,0000 <sup>*</sup>	12,04621	,000	-177,5762	-100,4238		
		mch	-112,3333 <sup>*</sup>	12,04621	,000	-150,9095	-73,7571		
uch		uc	138,33333 <sup>*</sup>	12,04621	,000	99,7571	176,9095		
		mc	139,00000 <sup>*</sup>	12,04621	,000	100,4238	177,5762		
		mch	26,66667	12,04621	,199	-11,9095	65,2429		
mch		uc	111,66667 <sup>*</sup>	12,04621	,000	73,0905	150,2429		
		mc	112,33333 <sup>*</sup>	12,04621	,000	73,7571	150,9095		
		uch	-26,66667	12,04621	,199	-65,2429	11,9095		
dia28		uc	mc	2,33333	63,43588	1,000	-200,8107	205,4774	
			uch	-347,0000 <sup>*</sup>	63,43588	,003	-550,1440	-143,8560	
			mch	-258,3333 <sup>*</sup>	63,43588	,015	-461,4774	-55,1893	
	mc	uc	-2,33333	63,43588	1,000	-205,4774	200,8107		
		uch	-349,3333 <sup>*</sup>	63,43588	,003	-552,4774	-146,1893		
		mch	-260,6667 <sup>*</sup>	63,43588	,014	-463,8107	-57,5226		
	uch	uc	347,00000 <sup>*</sup>	63,43588	,003	143,8560	550,1440		
		mc	349,33333 <sup>*</sup>	63,43588	,003	146,1893	552,4774		
		mch	88,66667	63,43588	,534	-114,4774	291,8107		
	mch	uc	258,33333 <sup>*</sup>	63,43588	,015	55,1893	461,4774		
		mc	260,66667 <sup>*</sup>	63,43588	,014	57,5226	463,8107		
		uch	-88,66667	63,43588	,534	-291,8107	114,4774		

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## 8.14 Anexo 14: Análisis Estadístico para Pruebas Mecánicas de Compresión

9. Collection de gijiricaçion de lillieçion				Prueba de muestras independientes						
				Prueba de Levene de igualdad de varianzas			prueba t para la igualdad de medias			
				F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar
Módulo de compresion	COI-1	'503	3	2,660	,178	11,801	4	,000	,0682967	,0057873
	COI-1	'542	3							
						11,801	2,507	,003	,0682967	,0057873



UNIVERSIDAD  
DE MALAGA