



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

GENERACIÓN DE UN SUSTITUTO ÓSEO
CON CAPACIDADES OSTEOINDUCTIVAS Y
OSTEOCONDUCTIVAS SEMBRADO CON
CÉLULAS MESENQUIMALES DE CORDÓN
UMBILICAL HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MALAGÓN ESCANDÓN ALDA MARÍA

DIRECTOR DE TESIS

DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ FACULTAD DE
MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DR. MATHIEU CHRISTIANE ANNE HAUTEFEUILLE FACULTAD
DE CIENCIAS

DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ FACULTAD
DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
EL HUESO	7
MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA	8
CÉLULAS DEL HUESO	10
FACTORES DE CRECIMIENTO.....	11
<i>Proceso de remodelación ósea</i>	14
<i>Proceso de reparación ósea</i>	16
DEFECTOS ÓSEOS Y SU CLASIFICACIÓN	18
INJERTOS ÓSEOS	18
INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	19
<i>Biomateriales</i>	19
<i>Andamios derivados de la matriz extracelular ósea</i>	20
<i>Métodos de obtención de andamios derivados de la matriz extracelular ósea</i>	22
<i>Descelularización</i>	22
<i>Desmineralización ósea</i>	25
<i>Hidrólisis de la proteína colágena</i>	25
CÉLULAS.....	26
<i>Células Troncales</i>	27
ANTECEDENTES	29
JUSTIFICACIÓN	31
OBJETIVOS	31
<i>Objetivo general</i>	31
<i>Objetivos específicos</i>	31
METODOLOGÍA	31
MATERIALES	31
<i>Muestras biológicas</i>	31
<i>Reactivos</i>	32
<i>Equipos</i>	32
<i>Software</i>	33
<i>Otros</i>	33
MÉTODOS.....	33
<i>Limpieza de los bloques de hueso bovino</i>	33
OBTENCIÓN DE ANDAMIOS A PARTIR DE LOS BLOQUES DE HUESO BOVINO MEDIANTE DESCELULARIZACIÓN, DESMINERALIZACIÓN, E HIDRÓLISIS DE LA PROTEÍNA DE COLÁGENA	33
<i>Secado y esterilización de andamios</i>	34
<i>Evaluación histológica de los andamios</i>	35
CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS	35
<i>Diámetro mayor de poro</i>	35
<i>Microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDS)</i>	36
<i>Espectroscopia Raman</i>	36
<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)</i>	36
<i>Pruebas mecánicas</i>	36
<i>Capacidad de absorción</i>	37

<i>Degradación</i>	37
HWJ-MCSSs.....	38
<i>Aislamiento de las hWJ-MSC de los cordones umbilicales</i>	38
<i>Inmunofenotipo de las hWJ-MSC</i>	38
<i>Cultivo de las hWJ-MSCs</i>	38
ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	39
<i>Adhesión celular</i>	39
<i>Citocompatibilidad de los andamios</i>	39
<i>Mineralización in vitro</i>	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
RESULTADOS.....	40
<i>Obtención de los andamios</i>	40
ANÁLISIS HISTOLÓGICO	41
<i>Comprobación de la descelularización de los andamios</i>	41
<i>Comprobación de la desmineralización de los andamios</i>	41
CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS	43
<i>Determinación de la estructura tridimensional de los andamios</i>	43
<i>Porosidad</i>	44
<i>Determinación de la composición inorgánica de los andamios</i>	45
<i>Determinación de la composición química de los andamios</i>	46
<i>Determinación de la presencia de colágena tipo I en los andamios</i>	48
<i>Módulo de Young de los andamios</i>	50
<i>Capacidad de absorción de los andamios</i>	51
<i>Degradación de los andamios</i>	52
HWJ-MSC	52
<i>Aislamiento de las hWJ-MSCs de los cordones umbilicales</i>	52
<i>Inmunofenotipo de las hWJ-MSCs</i>	53
<i>Cultivo de las hWJ-MSCs</i>	54
DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	55
<i>Adhesión celular</i>	55
<i>Citocompatibilidad de los andamios</i>	57
DETERMINACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN	61
<i>Depósito de fosfato de calcio</i>	61
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES.....	68
PERSPECTIVAS.....	68
REFERENCIAS	69

Agradecimientos

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM

Al apoyo recibido por: CONACYT número de becario 547082

Al director de tesis

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille

Dr. Javier Rolando Ambrosio

Al LaNSBio-DyT, Facultad de Ciencias, UNAM

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille

Diego Zamarrón Hernández

Al LaNSBio-DyT-UNICUA, Facultad de Ciencias, UNAM

Dra. Tatiana Fiordelisis Coll

M.C. Edgar Jiménez Díaz

Al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, LUCE-ICAT, UNAM

Dr. José Manuel Saniger Blesa

Dr. José Ocotlán Flores Flores

Dra. Selene Rubí Islas Sánchez

Al Laboratorio Central de microscopía, IF, UNAM

Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre

M. en C. Jaqueline Cañetas Ortega

Resumen

Introducción: El tejido óseo puede sufrir daños o pérdidas por diferentes causas, sin embargo, los traumatismos, la resección de tumores y las secuelas de cirugías, son las principales. Los defectos óseos críticos pueden tratarse mediante andamios o sustitutos óseos empleando la ingeniería de tejidos. Los andamios son estructuras que buscan imitar las características de la matriz extracelular nativa con el fin de sustituirla temporal o definitivamente.

Es de notar que tejidos descelularizados se han empleado con éxito para el reemplazo de otros órganos y tejidos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue obtener un andamio tridimensional de matriz extracelular ósea con la capacidad de inducir la formación de tejido óseo.

Método: En este trabajo procesamos hueso esponjoso bovino mediante descelularización y desmineralización con tres concentraciones diferentes de ácido clorhídrico (0.125 M, 0.25 M y 0.5 M) e hidrólisis de la colágena. Con el propósito de determinar sus propiedades físicas y químicas se evaluaron los diámetros de poro, los espectros obtenidos mediante FT-IR y Raman, la capacidad de absorción y degradación de los andamios. Además, se evaluaron las propiedades biológicas de la matriz extracelular ósea que es el componente de los andamios. En los andamios se sembraron células mesenquimales de la gelatina de Wharton y se determinó la citocompatibilidad, adhesión celular y depósito de fosfato de calcio como indicador de diferenciación celular.

Resultados: Se obtuvo un andamio de matriz extracelular ósea en la que se preserva la estructura y porosidad de la matriz extracelular ósea. Por los análisis de Raman y de FT-IR se determinó que el componente principal de los andamios era colágena de tipo I y que las diferentes concentraciones de ácido clorhídrico usadas para la obtención de los andamios tienen un efecto tanto en la hidrólisis de la colágena como en los motivos ocultos que se encuentran en las cadenas polipeptídicas de la colágena tipo I. La capacidad de absorción y de degradación también sufrieron cambios asociados a la concentración de ácido clorhídrico usada para la obtención de los andamios. Finalmente, con los ensayos *in vitro* se demostró que la concentración de ácido clorhídrico empleada para la obtención de los andamios afecta la citocompatibilidad, adhesión celular y depósito de fosfato de calcio cuando se cultivan células mesenquimales de la gelatina de Wharton en los andamios.

Conclusiones: Con los resultados de este trabajo se puede concluir que los andamios obtenidos a 0.125 M y 0.25 M de ácido clorhídrico, son buenos candidatos para el tratamiento de defectos óseos críticos debido a que pueden devolver el nicho biológico al sitio que sufrió daño o pérdida ósea y a que son mecánicamente estables. Asimismo, la reparación ósea debido a sus características osteoinductivas, osteoconductoras y osteogénicas. Finalmente, es necesario realizar estudios *in vivo* con objeto de evaluar la eficacia de estos andamios en modelos *in vivo* de defectos óseos críticos.

Abstract

Introduction: The bone can suffer damage or loss due to different causes. However, trauma, tumor resection, and the sequelae of surgeries are the main ones. Critical bone defects can be treated by scaffolds or bone substitutes using tissue engineering. Scaffolds are structures that seek to imitate the characteristics of the native extracellular matrix to replace it temporarily or permanently.

Decellularized tissues have been used successfully to replace other organs and tissues because they provide a porous, three-dimensional structure with extracellular matrix components, which can retain physical, chemical, and biological properties.

Method: In this work, we process bovine cancellous bone by decellularization, demineralization at three different hydrochloric acid concentrations (0.125 M, 0.25 M, and 0.5 M), and collagen hydrolysis. To determine the preservation of the physical and chemical properties, we evaluate the 3D structure and pore diameter. We analyze the spectra obtained by FT-IR and Raman, later the scaffolds' absorption and degradation capacity. Finally, we assessed the bone extracellular matrix's biological properties, which is the component of the scaffolds. We planted mesenchymal cells of Wharton's gelatin, which allowed us to determine the cytocompatibility, cell adhesion, and calcium phosphate deposit as an indicator of cell differentiation.

Results: The results indicate that the bone extracellular matrix's structure and porosity are preserved in the scaffolds obtained. Both Raman and by FT-IR determined that the main component of the scaffolds is type I collagen. The different concentrations of hydrochloric acid used to obtain the scaffolds affect the hydrolysis of collagen and on the cryptic motifs found in the polypeptide chains of type I collagen. The absorption and degradation capacity also suffered changes associated with hydrochloric acid concentration used to obtain the scaffolds. Finally, with the in vitro tests, we demonstrated that the hydrochloric acid concentration used to obtain the scaffolds affects the cytocompatibility, cell adhesion, and calcium phosphate deposition mesenchymal cells of Wharton's gelatin seeded and grown on the scaffolds.

Conclusion: With this work, we can conclude that the scaffolds obtained at 0.125 M and 0.25 M of hydrochloric acid are good candidates for treating critical bone defects and can return the biologically and mechanically stable niche that they favor bone repair. However, it is still necessary to continue with the biological characterization to subsequently evaluate its behavior in vivo models.

INTRODUCCIÓN

El hueso

El cuerpo humano está constituido por 206 huesos, que representan alrededor del 12 % del peso total del cuerpo humano. Las características de cada hueso varían dependiendo de su forma, tamaño, localización anatómica y tipo (Rahman *et al.* 2021). El hueso maduro se clasifica en dos tipos: cortical y esponjoso. El hueso cortical rodea al hueso esponjoso y le da forma y estructura, por otra parte, el hueso esponjoso conforma la estructura porosa de los huesos. En el hueso esponjoso se localiza la médula ósea (Figura 1).

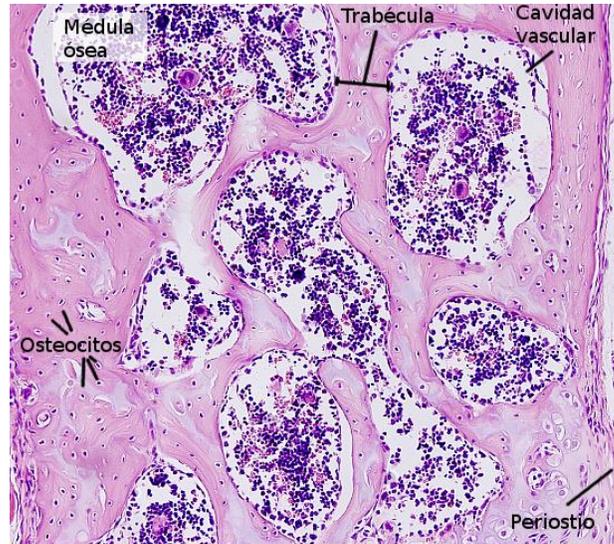


FIGURA 1

Estructura y componentes del hueso esponjoso. Tomado de https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_oseo.php

El hueso está formado por un tejido mineralizado complejo y altamente organizado, compuesto por la matriz extracelular ósea (MEC) que presenta dos fases una inorgánica y otra orgánica. La fase inorgánica está formada principalmente por nano cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que representan la mayor fuente de iones inorgánicos del cuerpo humano y participan en el balance calcio/fosfato (Kono *et al.* 2022; Koolen *et al.* 2020). La fase orgánica está compuesta principalmente de colágena tipo I.

Debido a su estructura, los huesos tienen 6 diferentes funciones:

1. Soporte: El esqueleto proporciona la estructura que soporta el cuerpo y mantiene su forma.
2. Movimiento: El movimiento óseo es impulsado por los músculos esqueléticos, que están unidos a los huesos en varios sitios mediante las articulaciones. Los músculos, los huesos y las articulaciones proporcionan la mecánica principal para el movimiento del cuerpo, todo coordinado por el sistema nervioso.
3. Protección: Los huesos protegen a los órganos y tejidos como cerebro, pulmones y médula ósea.

4. Almacenamiento: La matriz extracelular ósea es un reservorio de minerales como calcio y fosfato y la médula ósea puede almacenar hierro.
5. Regulación endocrina: Los osteoblastos secretan osteocalcina, la cual, participa en la regulación de insulina y el almacenamiento de grasa. Por otro lado, los osteoclastos son modulados en su función debido a que tienen receptores de calcitonina y por la paratohormona mediada por la osteoprotegerina (OPG), la cual es secretada por los osteoblastos. Estas hormonas son secretadas por la paratiroides y la tiroides respectivamente (Currey *et al.* 2006; Arai *et al.* 2021).

Matriz extracelular ósea

La matriz extracelular (MEC) es una estructura tridimensional acelular secretada por las células al espacio extracelular, se forma durante el desarrollo embrionario, cada órgano y tejido tiene una composición y una topología única, en general, se compone de agua, proteínas y polisacáridos (Arai *et al.* 2021).

La matriz extracelular ósea esta conformada por 60% de matriz inorgánica y 40% de matriz orgánica, en donde los principales componentes inorgánicos de la MEC son la hidroxiapatita y elementos traza; mientras que la matriz orgánica está compuesta por 90% de colágena, ~5% proteínas no colágenas, ~2% de lípidos y <1% de factores de crecimiento polipeptídicos (Kono *et al.* 2022) (Figura 2).

Proteínas colágenas

La colágena tipo I, III y V son las más abundantes en el hueso, sus funciones más importantes son aportar soporte mecánico mediante entrecruzamiento inter e intra catenario de la colágena que también permite la interacción de las fibras de colágena con otras proteínas (Cho *et al.* 2010; Chamieh *et al.* 2016; Chen *et al.* 2018) y guiar el comportamiento celular mediante señales bioquímicas, topológicas y de rigidez (Badylak *et al.* 2009; Badylak *et al.* 2011; Heuschkel *et al.* 2019).

Proteínas no colágenas

1. Proteoglucanos: Los proteoglucanos son la proteína no colágena más abundante en la matriz extracelular ósea, se caracterizan por la presencia de la unión covalente de residuos polisacáridos de cadena larga (glicosaminoglicanos, GAG) a moléculas de la proteína central. Los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) (Iozzo y Schaefer 2015), son proteínas extracelulares que se encuentra de forma predominante en la matriz mineralizada y que interactúan con los receptores de la superficie celular y las citocinas para el control de la proliferación celular, las interacciones de la matriz celular y la mediación de la deposición de hidroxiapatita (Ramadass *et al.* 2014) (Nguyen and Panitch, 2022).
2. Las glicoproteínas contienen moléculas de carbohidratos unidas covalentemente en la cadena de proteínas en varias combinaciones y posiciones. Las glicoproteínas, como la fosfatasa alcalina, la osteonectina y las proteínas que contienen motivos RGD (osteoadherina, trombospondina, fibronectina, vitronectina, osteopontina, sialoproteína ósea), la fibrilina y la tetranectina se

producen en diferentes etapas de la maduración osteoblástica. Tienen una amplia gama de funciones que van desde el control de la proliferación celular, las interacciones de la matriz celular y la mediación de la deposición de hidroxapatita (Carvalho *et al.* 2021).

3. Las proteínas con ácido gamma-carboxi-glutámico son proteínas de la MEC ósea contiene ácido γ -carboxiglutámico (Gla), un ácido glutámico modificado producido por una modificación postraduccional dependiente de la vitamina K. Se localiza en la matriz extracelular ósea y tejidos mineralizados. Las principales proteínas que contienen Gla en el hueso son la osteocalcina (OCN), la proteína Gla de la matriz (MGP) y la periostina (Wen *et al.* 2018). Participan en modular el metabolismo del calcio mediante su asociación con la hidroxapatita plegamiento del colágeno y la fibrilogénesis, lo cual es esencial para el ensamblaje de la matriz extracelular.

Los componentes y topografía de la MEC permiten la adhesión celular, migración, proliferación, señalización, diferenciación de células endógenas en el sitio donde ocurre una lesión o daño y la homeostasis del tejido. Por otro lado, la estructura de la MEC y sus poros interconectados favorecen la vascularización. También la MEC confiere, la señalización por medio de los factores de crecimiento regulan las interacciones célula-matriz y célula-célula y la angiogénesis, que es crucial durante la reparación del tejido óseo dañado (Mansour *et al.* 2017; Porzionato *et al.* 2018). La MEC proporciona integridad y elasticidad al tejido, y le confiere al hueso la capacidad de autorenovación ya que se encuentra en constantemente recambio debido a los receptores, factores de crecimiento y el pH del entorno local para controlar el desarrollo, la función y la homeostasis de los tejidos y órganos.

Sin embargo, los defectos óseos críticos representan un reto debido a sus dimensiones, geometría, complejidad, daño de tejidos blandos circundantes y otras condiciones de cada individuo, como la edad y estado general de salud.

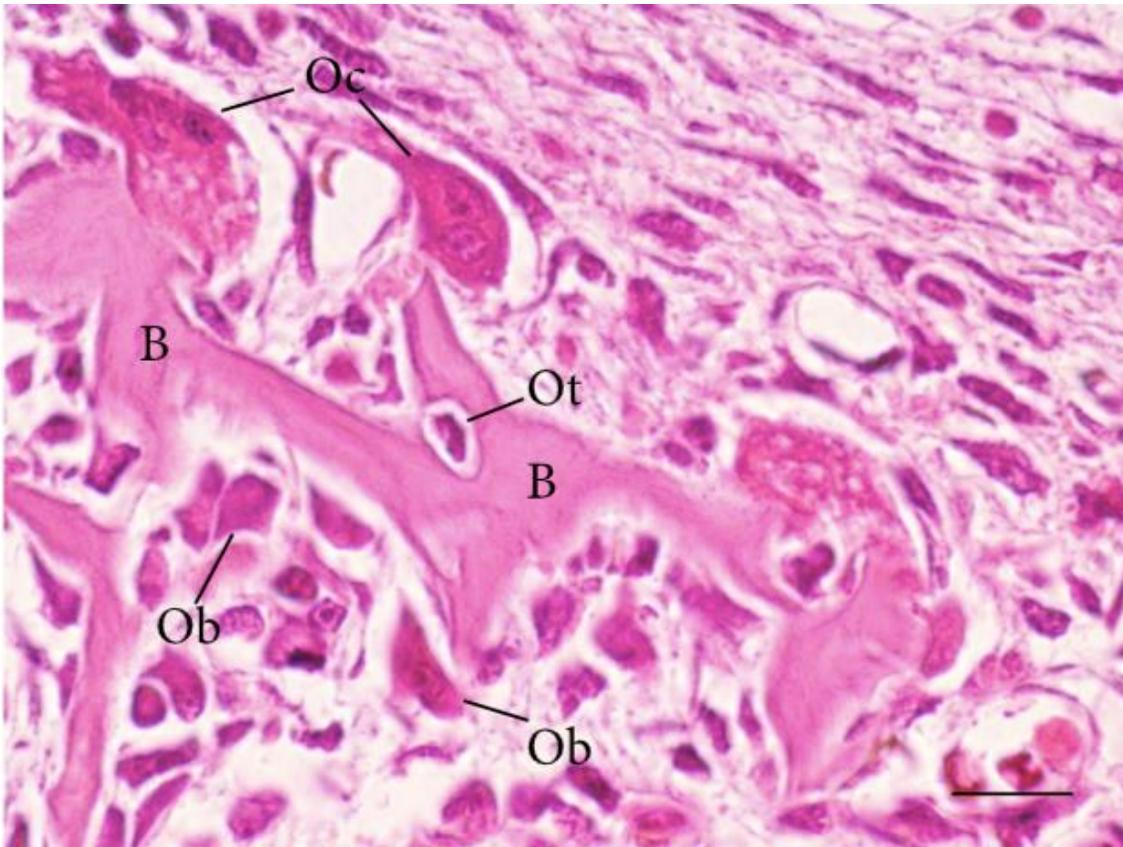


FIGURA 2

Estructura de la matriz extracelular ósea. Ob osteoblastos, Oc osteoclastos, Ot osteocitos y B Matriz extracelular ósea. Obtenida de <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/421746/fig1/>

Células del hueso

El hueso está formado por cuatro tipos de células: los osteoblastos, los osteoclastos, los osteocitos y las células osteoprogenitoras. Los osteoblastos, son las células responsables de formar MEC ósea orgánica y se localizan en los conductos de Havers, de Volkman y en el endostio. Los osteoblastos sintetizan y secretan colágena, fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteonectina, entre otros. Además, favorecen el depósito de las sales de fosfato de calcio. Cuando en la MEC ósea orgánica se depositan cristales de fosfato de calcio y de carbonato de calcio el resultado es que los osteoblastos quedan atrapados dentro de unos pequeños espacios llamados lagunas. Por otro lado, cuando los osteoblastos dejan de secretar MEC ósea orgánica, su citoplasma pasa de basófilo a eosinófilo por la disminución de retículo endoplásmico rugoso. Es en esta condición en la que se denominan osteocitos. Los osteocitos procuran el mantenimiento de la MEC ósea inorgánica del hueso maduro, donde son las células más abundantes. Las células osteoprogenitoras no están totalmente diferenciadas y tiene altas tasas de mitosis. Las células osteoprogenitoras provenientes del periostio y las células troncales de médula ósea son inducidas a diferenciarse a osteoblastos por la influencia de distintos factores de

crecimiento, especialmente por las proteínas morfogenéticas óseas (por sus siglas en inglés, BMPs). Por otra parte, la actividad de los osteoblastos y osteoclastos es responsable de la constante remodelación ósea. Los osteoclastos se encuentran en las superficies óseas, son células multinucleadas que se originan de monocitos y macrófagos. La constante remodelación ósea implica que se forma hueso constantemente, mientras que el hueso lesionado se reabsorbe para lograr remodelarlo o liberar calcio en deficiencias de este mineral. (Chen and Lv 2018).

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento polipeptídicos representan aproximadamente <1% de la matriz; se dividen en dos grupos: a) Endógenos: factores locales producidos por osteoblastos y células del microambiente óseo con posible acción autocrina o paracrina, y b) exógenos: factores endocrinos producidos que actúan sobre células diana óseas específicas y actúan como mensajeros (Kono *et al.* 2022)

Para fines de este trabajo nos centraremos en los factores de crecimiento polipeptídicos endógenos, ya que la matriz extracelular juega un papel fundamental en el control de la distribución y presentación de los factores de crecimiento polipeptídicos. En primer lugar, los factores polipeptídicos locales se almacenan temporalmente en la matriz a la espera de la señalización celular. En segundo lugar, la regulación de la biosíntesis de la matriz extracelular por factores de crecimiento induce su modulación mediante un circuito de retroalimentación que implica la adsorción de los factores a una nueva matriz.

Sistema RANK-L/OPG (ligando de NF Kappa B activador de receptor/osteoprotegerina (OPG))

La OPG protege el hueso de una reabsorción excesiva al unirse a RANKL y evitar que se una a RANK. Recientemente se ha estudiado que la concentración relativa de RANKL y OPG en el hueso es un determinante importante de la masa y rigidez ósea. (Carvalho *et al.* 2021).

Factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés, TGF- β)

El TGF- β es uno de los factores de crecimiento que más se almacena en la matriz extracelular ósea. Sus funciones principales en estudios *in vitro* del TGF- β son los efectos sobre la proliferación celular y sobre la formación de la matriz, sin embargo, se ha observado que estos efectos varían dependiendo de los diferentes tipos celulares y la etapa de diferenciación celular en la que se encuentren dichas células, debido a que puede actuar tanto sobre los precursores de los osteoclastos, inhibiendo su proliferación y su formación como sobre los osteoclastos maduros, induciendo su apoptosis. Sus efectos bioquímicos derivan de la unión con receptores de membrana presentes en varias células derivadas del hueso (Deschaseaux *et al.* 2009).

El TGF- β también juega un papel fundamental en la remodelación ósea. El TGF- β estimula la síntesis de proteínas de la matriz, tiene efectos sobre las células óseas responsables de la formación y reabsorción ósea, y es muy abundante en los huesos (Ghayor *et al.* 2018).

Proteínas morfogenéticas óseas (por sus siglas en inglés, BMPs)

Son factores de crecimiento que pertenecen a la familia de TGF- β , tienen la capacidad de inducir la formación de hueso, cartílago y tejido conjuntivo.

Numerosos estudios identifican a las proteínas morfogenéticas óseas BMPs como actores principales en la diferenciación de osteoblastos y, por lo tanto, en la formación de hueso. Sin embargo, en los últimos años, también se ha reportado cada vez más sobre el papel fundamental de estos factores de crecimiento multifuncionales en la formación y actividad de los osteoclastos. (Zhu *et al.* 2017) (Wen *et al.* 2018).

Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (por sus siglas en inglés, IGF-1)

El IGF-1 es un factor de crecimiento y diferenciación en diversos tejidos, especialmente en el hueso, tiene una acción mitógena sobre los condrocitos y los osteoblastos. También es capaz de estimular la diferenciación osteoblástica mediante el aumento de la transcripción de la proteína colágena, de osteocalcina, la producción de citocinas y la formación-activación de los osteoclastos.

En estudios recientes se ha estudiado la capacidad del IGF-1 para promover la regeneración de tejido asociada con una reducción de las citocinas proinflamatorias y la correspondiente estimulación de las citocinas antiinflamatorias (Umebayashi *et al.* 2017).

Prostaglandinas

Las prostaglandinas son producidas localmente por los osteoblastos, gracias a la expresión de las prostaglandinas G/H ciclooxigenasas (COX 1 y 2). La prostaglandina E2 estimula la actividad de resorción ósea mediante el aumento de la proliferación de los precursores osteoclasticos. Las prostaglandinas también aumentan la frecuencia de activación de las BMU, que dan como resultado un incremento de la masa ósea (Ghayor *et al.* 2018).

Factor estimulador de colonias de granulocitos y de macrófagos (por sus siglas en inglés, GM-CSF)

Es una citocina que se produce en diferentes tejidos y promueve la maduración de células precursoras localizadas en la médula ósea a neutrófilos y monocitos/macrófagos. Actúa regulando la proliferación y diferenciación de células troncales, progenitoras hematopoyéticas y endoteliales originadas la médula ósea, así como células no hematopoyéticas como fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos y que también es indispensables para la diferenciación de los osteoclastos.

Recientemente, se informó que las citocinas hematopoyéticas, incluido el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o la eritropoyetina, tenían efectos en el reclutamiento celular después de una lesión (Aslan *et al.* 2006).

Factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés, EGF)

El factor de crecimiento epidérmico es un potente mitógeno de las células de origen mesodérmico y ectodérmico. Los efectos angiogénicos del EGF, se han demostrado previamente. Además, diferentes estudios *in vitro* demostraron que el EGF afecta a procesos asociados con la cicatrización ósea, como la diferenciación de osteoblastos y la resorción ósea (Blair *et al.* 2018).

Factor de crecimiento fibroblástico (por sus siglas en inglés, FGF)

El FGF-1 y el FGF-2 se producen por los osteoblastos y se almacenan en la matriz extracelular por su alta afinidad a los proteoglicanos. El FGF-1 y el FGF-2 aumentan la proliferación celular osteoblástica. También estimulan la síntesis de fosfatasa alcalina y osteocalcina e inhiben la producción de la proteína colágena, la respuesta a la PTH y estimulan la resorción ósea (Mansour *et al.* 2017; Porzionato *et al.* 2018).

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (por sus siglas en inglés, PDGF)

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas estimula la síntesis de la colágena mediante la estimulación de los osteoblastos. Se ha estudiado que también induce la proliferación de fibroblastos, así como de células musculares lisas, la neovascularización, la síntesis y remodelación de la colágena, por lo que favorece la cicatrización y el proceso de reparación ósea. Es capaz de actuar sinérgicamente con otras citocinas óseas como IL-4 y el factor de crecimiento endotelial vascular (por sus siglas en inglés, VEGF) (Ghayor *et al.* 2018).

Factor de crecimiento transformante alfa (por sus siglas en inglés, TGF- α)

Es un polipéptido mitógeno que estimula el desarrollo de los precursores de osteoclastos y la resorción ósea. El TGF- α es un ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico, que activa una vía de señalización para la proliferación, diferenciación, desarrollo celular y la cicatrización (Raggatt, 2010).

Factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés, TNF- α)

Es sintetizado por monocitos, macrófagos activados, queratinocitos y células osteoblásticas estimuladas por la IL-1, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y el lipopolisacárido (LPS). Al igual que la IL-1, estimula la resorción osteoclástica, mediante el aumento de la producción de osteoclastos multinucleados y modificando la actividad de los osteoclastos maduros. Además, el TNF- α potencia la actividad de la IL-1. Al igual que la IL-6, actúa sobre la osteoclastogénesis por vías dependientes de RANK/ RANK-L y por vías independientes, en cuyo caso implica al MG-CSF (Raggatt, 2010).

En modelo murino se ha demostrado que el TNF- α , que promueve primero la migración de células estromales y luego la diferenciación osteogénica a bajas concentraciones, sin embargo, el TNF- α es inhibitorio de la osteogénesis a altas concentraciones (Amiryaghoubi *et al.* 2020).

Interferón gamma (por sus siglas en inglés, IFN- γ)

Se ha estudiado como el IFN- γ puede promover la diferenciación de osteoblastos e inhibir la formación de adipocitos en la médula ósea. IFN- γ juega un papel dual en los osteoclastos dependiendo de su etapa (Hwang *et al.* 2017)(Nishikimi *et al.* 2017).

Interleucina 1 (por sus siglas en inglés, IL-1)

La IL-1 es producida por los monocitos y por las células osteoblásticas o troncales cuando éstas son estimuladas por el LPS o el TNF- α . Su acción principal en la remodelación ósea es la estimulación de la resorción ósea a través del reclutamiento, la actividad y el retraso de la apoptosis de los osteoclastos, mediante mecanismos dependientes o no del sistema RANK/RANK-L. La IL-1 está implicada en la resorción ósea en condiciones patológicas.

sin embargo, se ha demostrado su participación en la remodelación ósea en condiciones fisiológicas (Amiryaghoubi *et al.* 2020).

Interleucina 4 (por sus siglas en inglés, IL-4)

La IL-4 es producida por los linfocitos T activados e inhibe la resorción ósea, también se ha estudiado su posible papel durante la remodelación ósea (Ghayor *et al.* 2018).

Interleucina 6 (por sus siglas en inglés, IL-6)

La IL-6 es producida por monocitos, macrófagos activados y células troncales y osteoblastos cuando son estimulados por la PTH, la IL-1, el TNF- α , el TGF- β o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

La IL-6 modula la diferenciación osteoclástica por medio de las células troncales, cuando la IL-6 se une a los receptores en los preosteoclastos, promueven la osteoclastogénesis, lo que da como resultado un aumento de los niveles de resorción ósea (Glipin and Yang 2017).

Interleucina 11 (por sus siglas en inglés, IL-11)

La IL-11 es producida por las células de la médula ósea y estimula la formación osteoclástica.

En los últimos años, la citocina IL-11, se ha determinado que es en una proteína reguladora importante para la formación, remodelación y resorción ósea. (Ghayor *et al.* 2018).

Interleucina 18 (por sus siglas en inglés, IL-18)

La IL-18 es producida por macrófagos activados, células dendríticas, quizás linfocitos, y por células no inmunitarias; e induce la activación de células NK y linfocitos T citotóxicos. Además, estimula la producción de IFN- γ e incrementa el efecto de la IL-12 e inhibe la formación osteoclástica.

IL-18 desempeña un papel importante en la reparación de fracturas al coordinar el reclutamiento de las BMSC, así como la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos; sin embargo, el mecanismo exacto aún no está claro (Glipin and Yang 2017).

Proceso de remodelación ósea

El hueso mantiene su homeostasis mediante un proceso complejo de remodelación ósea que implica una serie de eventos celulares y moleculares, que tienen como objetivo; la resorción y depósito de hueso; este proceso implica 5 fases (Raggatt, 2010): 1) activación, 2) resorción, 3) inversa, 4) formación y 5) terminación. **Error! Reference source not found..**

Antes de la activación, la superficie ósea se cubre con células del revestimiento óseo, pre-osteoblastos intercalados con macrófagos osteales (osteomacs).

1. En la fase de activación, hay una señal de remodelación ósea endocrina mediada por la paratohormona (por sus siglas en inglés, PTH), que se une a su receptor en los pre-osteoblastos. El defecto crítico en la matriz ósea mineralizada produce una apoptosis localizada de los osteocitos, esto reduce la concentración local de TGF- β y la inhibición de la osteoclastogénesis.

2. En la fase de resorción, se lleva a cabo en respuesta a la señalización de PTH, los osteoblastos liberan la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (por sus siglas en inglés, MCP-1) que atrae pre-osteoclastos en la superficie ósea. Además, disminuye la expresión de OPG en osteoblastos y aumenta la producción de factor estimulante de colonias 1 (por sus siglas en inglés, CSF-1) y del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (por sus siglas en inglés, RANKL) lo que promueve la proliferación de precursores de osteoclastos y la diferenciación de osteoclastos maduros. Los osteoclastos maduros se anclan a los sitios de unión a arginina- glicina- ácido aspártico (RGD) de la colágena, lo que creará un microambiente localizado que facilita la degradación de la matriz ósea mineralizada.
3. En la fase inversa, los macrófagos envuelven y eliminan las fibras colágenas desmineralizadas del hueso dañado. Se generan señales de transición que detienen la resorción ósea y estimulan el proceso de formación ósea.
4. En la fase de formación, las señales que inducen la formación ósea, las moléculas, y los osteoclastos maduros surgen de la matriz ósea degradada. La PTH y la activación mecánica de los osteocitos reducen la expresión de esclerostina, lo que favorece la formación de hueso mediante la vía de señalización Wingless e Int (por sus siglas en inglés, Wnt).
5. En la fase de terminación, es probable que la expresión de esclerostina regrese y detenga la formación de hueso. El osteoide recién depositado se mineraliza y la superficie ósea regresa a un estado de reposo con células de revestimiento óseo intercaladas con osteoMacs, y el ciclo de remodelación concluye (Raggatt, 2010).

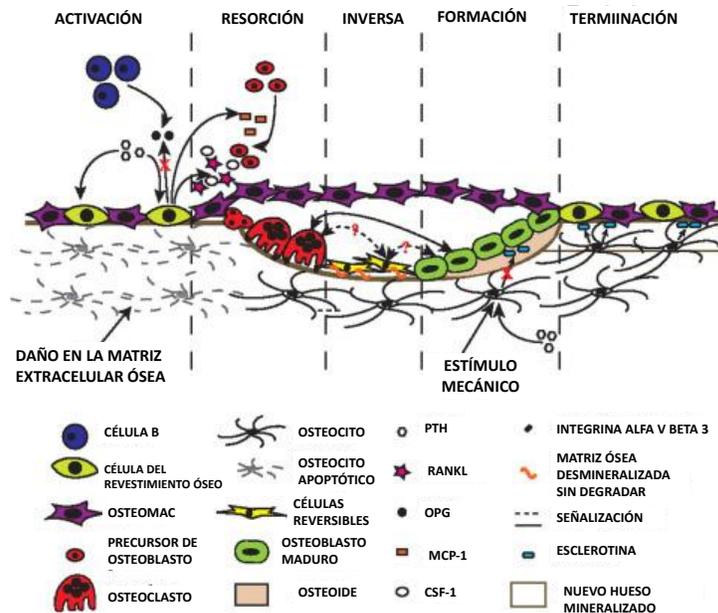


FIGURA 3

Proceso de remodelación ósea que implica una serie de eventos celulares y moleculares, que tienen como objetivo; la resorción y deposición ósea; este proceso implica 5 fases: 1) activación, 2) resorción, 3) inversa, 4) formación y 5) terminación. Traducido de

Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108.

Es importante notar que las fases de remodelación ósea son secuenciales tanto en tiempo como en su duración. Sin embargo, hay diferentes factores capaces de alterar la remodelación ósea y que causan que la remodelación sea insuficiente en extensión y/o grado de mineralización.

Proceso de reparación ósea

El proceso de reparación ósea inicia posterior a una lesión o daño al hueso. Combina una serie de eventos del desarrollo embriológico del esqueleto en donde interactúan la matriz extracelular, las células y los factores de crecimiento. El proceso de reparación ósea se divide en 4 etapas: 1) inflamación, 2) formación de callo óseo blando, 3) formación de callo óseo duro y 4) remodelación (Figura 4).

1. **Inflamación.** Después de una lesión, hay un sangrado que forma un hematoma, esta fase está regulada por mediadores de la inflamación donde se reclutan macrófagos, plaquetas y células proinflamatorias, que secretan factores de crecimiento y citocinas, que permiten la formación de un coagulo de fibrina. Al sitio de la lesión también llegan células osteoprogenitoras y endoteliales, que al diferenciarse y organizarse forman hueso (Deschaseaux *et al.* 2009). Esto sucede tanto en la vía de osificación intramembranosa como en la endocondral y formación nuevos capilares. Durante la etapa más temprana de la reparación ósea, el homólogo hedgehog indio (por sus siglas en inglés, *Ihh*) induce la expresión del factor de transcripción 2 relacionado con Runt (por sus siglas en inglés, *Runx2*).
2. **Formación de callo óseo blando.** Los daños o lesiones óseas se caracterizan por la pérdida de la continuidad y estabilidad mecánica, en donde es necesario un nicho estable para que se lleve a cabo la reparación ósea. Los factores de crecimiento guían la proliferación de los fibroblastos y de los condrocitos, estas células son las encargadas de sintetizar una matriz cartilaginosa, que servirá de soporte temporal; los factores de crecimiento también regulan la morfogénesis de vasos sanguíneos y capilares en la zona donde se lleva a cabo reparación ósea (Ghayor *et al.* 2018).
3. **Formación de callo óseo duro.** En esta etapa las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) están involucradas en favorecer el compromiso fenotípico de las células osteoprogenitoras para lograr la diferenciación a osteoblastos inducidas por *Runx2* y *distal-homeobox 5* (por sus siglas en inglés, *Dlx5*), las cuales se activan por la proteína cinasa activada por mitógeno (por sus siglas en inglés, *MAPK*). Por otra parte, las proteínas *Wnt* pueden inducir la proliferación de osteoprogenitores (pre-osteoblastos y osteocondroblastos). Cuando los osteoblastos maduran, pueden expresar inhibidores de *Wnt* tales como *Dickkopf 1* (por sus siglas en inglés, *DKK1*) que está presente en la pérdida ósea inducida por inflamación. Durante esta etapa, los osteoblastos producen la matriz ósea mineralizada, iniciando en las áreas estables del callo blando, lo que permite

formar el callo óseo duro, que aporta mayor estabilidad mecánica, el callo blando que es inestable mecánicamente y que es eliminado de manera gradual (Glipin and Yang 2017). Es de notar que la revascularización y el aporte de oxígeno son indispensables para el éxito de esta fase.

4. Remodelación: Los osteoclastos son células derivadas de células hematopoyéticas, capaces de degradar el hueso mineralizado. Los osteoclastos se forman a través de RANKL y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Estas citocinas son secretadas por linfocitos T y B activados y por pre-osteoblastos. La maduración ósea se lleva a cabo cuando matriz del tejido conjuntivo y cartilaginoso es sustituido por hueso mediante una osificación endocondral. Posteriormente, los osteoblastos y canales vasculares quedan inmersos en la matriz mineralizada y se forman las trabéculas óseas (Hayashi *et al.* 2020). La actividad de los osteoclastos puede ser regulada por IL-10 y por OPG. Los osteoclastos participan en el remodelado del tejido óseo reparado degradando matriz ósea, lo que libera varias citocinas y factores de crecimiento, como las BMP y IGF induciendo activación de osteoclastos inmaduros. Finalmente se deposita hueso compacto por acción de los osteoblastos en las lagunas de resorción de los osteoclastos (Hassani *et al.* 2022)

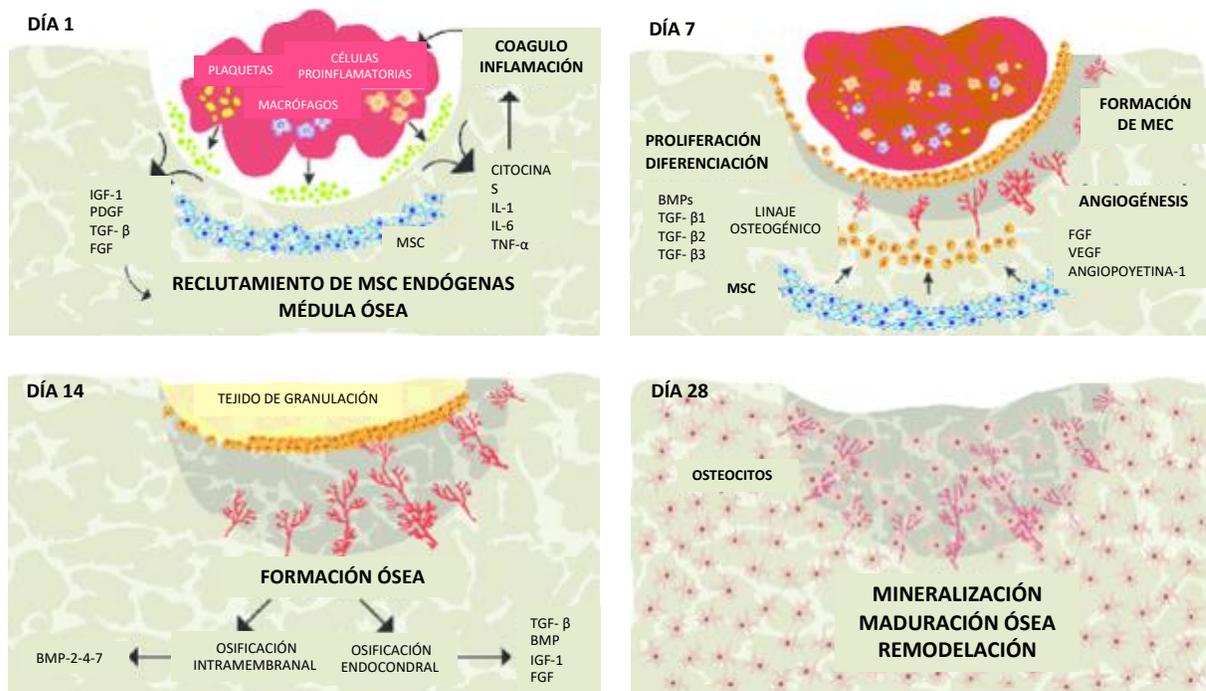


FIGURA 4

El proceso de reparación ósea se divide en 4 etapas: 1) inflamación, 2) formación de callo óseo blando, 3) formación de callo óseo duro y 4) remodelación. Traducido de Chaparro, O., & Linero, I. (2016). Regenerative medicine: a new paradigm in bone regeneration. *Adv Techn Bone Regen*, 1, 253-274.

Defectos óseos y su clasificación

Los defectos óseos son la pérdida de la continuidad del tejido óseo, la etiología de los defectos óseos críticos es diversa, a menudo son secuelas de impactos traumatismos, enfermedades, resección tumoral, infecciones y cirugías.

Los defectos óseos se clasifican de acuerdo con su extensión como no críticos y críticos:

- Los defectos óseos no críticos son aquellos en los que la pérdida de continuidad es menor a 1 cm de diámetro y que el hueso es capaz de promover la reparación del tejido óseo circundante (Atala, 2015).
- Los defectos óseos críticos se definen por la pérdida de la continuidad del tejido óseo con un diámetro mayor a 1 cm en donde se pierde el nicho biológico y mecánicamente estable. Por lo anterior, el hueso circundante no es capaz de promover reparación del tejido óseo perdido y que requieren de la adición de materiales o injertos óseos (Atala, 2015).

Existen diferentes opciones de tratamiento de los defectos óseos críticos, como los autoinjertos, los aloinjertos, xenoinjertos, biomateriales, la ingeniería de tejido óseo que se enfoca en métodos para reemplazar o reparar hueso para restaurar, mantener o mejorar sus funciones *in vivo* (Heuschkel *et al.* 2019). Enseguida analizaremos estas opciones, así como sus ventajas y desventajas en su aplicación clínica.

Injertos óseos

Como se mencionó anteriormente, cuando los defectos óseos son críticos y el hueso no es capaz de inducir la autoreparación, como en el caso de las complicaciones de las fracturas, que conducen a defectos óseos tardíos es necesario realizar un procedimiento quirúrgico y colocar injertos o sustitutos óseos en el sitio de la lesión, daño o pérdida ósea (Hwang *et al.* 2017; Heuschkel *et al.* 2019).

En la actualidad, el injerto óseo autólogo es el estándar de oro para tratar los defectos óseos críticos. Los injertos óseos autólogos consisten en extraer hueso del propio cuerpo del paciente, generalmente de la cresta iliaca o de la fíbula. Este injerto se considera como una solución segura en términos de compatibilidad y ausencia de respuesta inmune, pero también con riesgos y costos mayores para el paciente, porque debe someterse a dos procedimientos quirúrgicos (Hwang *et al.* 2017). Además, la edad, estado general de salud, tratamientos con radioterapia y dimensiones del defecto crítico impactan directamente en la disponibilidad y calidad del injerto obtenido y por lo tanto pueden limitar la aplicación y el éxito clínico de esta técnica. Cuando algunas de las condiciones mencionadas anteriormente no se cumplen, no se pueden realizar los injertos autólogos, y una alternativa a ellos son los aloinjertos (Naso *et al.* 2012; Wong *et al.* 2014; Heuschkel *et al.* 2019). Si embargo, diversos estudios han demostrado que el tratamiento con aloinjertos óseos resulta en una remodelación ósea deficiente, con una reabsorción incompleta del injerto, con una revascularización limitada y puede presentar problemas relacionados con rechazo inmunológico, así como riesgo incrementado de infecciones.

Como alternativa, también se ha explorado el uso de injertos óseos sintéticos. De hecho, hay una gran variedad de sustitutos óseos que de acuerdo con su origen se clasifican en naturales, sintéticos y compositos (Tabla 1), cada uno con diferentes ventajas y desventajas (Tabla 2). Este tipo de injertos se han diseñado y fabricado con el objetivo de

imitar a la matriz extracelular ósea y devolver la forma y la función ósea, sin embargo, pueden presentar inestabilidad estructural y volumétrica, contracción del diámetro mayor de poro, osteointegración deficiente, probabilidad de causar infecciones y rechazos inmunológicos, entre otras. Estas situaciones médicas han impedido su uso en la clínica de manera exitosa.

Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos tiene como objetivo reemplazar o reparar tejidos y órganos perdidos o dañados (Wobma, 2016). Desde mediados de los años 80^s, la ingeniería de tejidos emergió como un área de investigación para el desarrollo *in vivo e in vitro* de órganos y tejidos como piel, cartílago, hígado, vasos sanguíneos, entre otros.

Para construir órganos y tejidos *in vitro e in vivo*, es necesario abordar diferentes áreas como: la morfogénesis, la biología del desarrollo, la diferenciación celular, la biología molecular, las interacciones de la matriz extracelular, la expresión de genes y la física, por mencionar algunas (Lanza, 2020).

La ingeniería de tejidos se basa en:

1. El uso de biomateriales para imitar la estructura tridimensional nativa de un órgano o tejido. Los biomateriales son utilizados como una plataforma para la formación del nuevo tejido ya que sobre ellos se siembran células y también se pueden incorporar factores de crecimiento.
2. Tipos celulares apropiados capaces de reparar o reemplazar un órgano o tejido.
3. Nutrientes y factores de crecimiento que permitirán la adhesión, proliferación, diferenciación y función celulares.

La ingeniería de tejidos emplea varios enfoques tecnológicos, que van más allá de los trasplantes tradicionales y las terapias de reemplazo. El enfoque terapéutico puede incluir el uso de células troncales, moléculas solubles, ingeniería genética y terapia celular.

Como se mencionó anteriormente, la aplicación exitosa de la ingeniería de tejido óseo puede evitar desafíos relacionados con otras opciones de tratamiento que involucran autoinjertos o aloinjertos. Además de los problemas materiales, una comprensión clara de la biología que involucra a las células, la matriz extracelular (MEC) y los factores de crecimiento es fundamental en la ingeniería del tejido óseo.

Biomateriales

Se define a los biomateriales como cualquier sustancia o combinación de sustancias, distintas a los fármacos, de origen natural o sintético que se pueden emplear durante un lapso indefinido de tiempo con el objetivo de sustituir parcial o totalmente cualquier tejido u órgano, devolviéndole a estos, la forma y la función (Kochetkova *et al.* 2021).

Idealmente, los biomateriales usados como andamios o sustratos deben tener las siguientes 4 características:

1. Una estructura tridimensional altamente porosa interconectada para favorecer el crecimiento y adhesión celular, el transporte de nutrientes y el desecho de metabolitos (Ma *et al.* 2020). También la porosidad de los materiales para aplicaciones en la ingeniería de tejidos es importante, particularmente para piel y tejidos musculoesqueléticos, porque

influye en la actividad celular, adhesión celular, proliferación, vascularización, difusión de nutrientes, metabolitos y productos de desecho (Sarker *et al.* 2016). Los macroporos son indispensables para el éxito clínico de los andamios ya que se ha demostrado que el tamaño más eficaz es de ~ 300 a 500 μm , lo que permite que sean ocupados por hueso nuevo o vasos sanguíneos (Hayashi, Munar e Ishikawa 2020) (Yu *et al.* 2017).

Varios autores han propuesto que el diámetro de los poros de los andamios con aplicación en el tejido óseo idealmente debe estar entre 300-1300 μm y conformar estructuras tridimensionales con un 90% de poros interconectados en toda la estructura (Ghayor y Weber 2018) (Koolen *et al.* 2020). Sin embargo, la porosidad en este rango y la interconexión de poros son características difíciles de recrear en los materiales fabricados por diversas técnicas (Hayashi, Munar e Ishikawa 2020) (Sarker *et al.* 2016), debido a la limitación de reproducir la estructura en un formato tridimensional (Yu *et al.* 2017) (Qiu *et al.* 2022), y en algunos otros casos como en el uso de la bioimpresión debido a la contracción de los materiales.

2. Ser biocompatibles y si son bioreabsorbibles tener una tasa de degradación controlable, que tenga como característica el ser inversamente proporcional a la proliferación de células o tejidos *in vitro* y/o *in vivo*.
3. Poseer una composición química y nanotopográfica de superficie que permita la adhesión celular, proliferación y diferenciación celular.
4. Tener propiedades mecánicas que sean similares a las de los tejidos a sustituir en el sitio de implantación (Koolen *et al.* 2020).

De acuerdo con su composición, los biomateriales pueden clasificarse en 3 tipos:

1. Naturales. Se caracterizan por ser productos, compuestos o sustancias producidas por un organismo vivo. Estos biomateriales se han empleado durante siglos, sin embargo, el éxito clínico al emplearlos depende de las técnicas de fabricación y obtención. Como ejemplos de este tipo de biomateriales están los injertos óseos (alógenicos y xenogénicos), colágena, ácido hialurónico y quitosán, entre otros.
2. Sintéticos. Estos biomateriales son fabricados a partir de sustancias o mezclas de ellas empleando un monómero para su unión y herramientas tecnológicas para su fabricación. Entre estos tipos de biomateriales están los metales, polímeros sintéticos y cerámicos.
3. Compositos. Esta clase de biomateriales se obtienen mediante dos fases, una orgánica que generalmente son fibras o recubrimientos, y otra fase llamada inorgánica que está conformada por una matriz que proporciona estructura y estabilidad al andamio.

El potencial de la ingeniería de tejidos se debe a que se pueden diseñar materiales y sustratos para el reemplazo de órganos y tejidos que permite comprender y analizar el comportamiento celular, la proliferación y la diferenciación celular. Estas investigaciones han generado una evidencia que demuestra que tanto el entorno físico, químico y mecánico al que están sujetas las células puede tener efectos en el comportamiento celular, incluido la proliferación y la diferenciación (Lanza, 2020).

Andamios derivados de la matriz extracelular ósea

La MEC es una estructura tridimensional acelular secretada por las células. Está compuesta por proteínas y polisacáridos agrupados en fibras, sustancia fundamental y moléculas de adhesión. La MEC de cada tipo de tejido tiene una composición y topología

únicas obtenidas durante el desarrollo embriológico. En el hueso hay dos tipos de MEC, la orgánica y la inorgánica (Chen B. L., 2007). Los principales componentes inorgánicos de la MEC son el calcio, fosfato, hidroxapatita y otros minerales en menor concentración. En contraste, los componentes orgánicos de la MEC son más complejos, y está constituida fundamentalmente por colágena I y proteínas no colágenas. La MEC orgánica es sintetizada por los osteoblastos y posteriormente se somete a un proceso mineralización (Mansour et al. 2017). Las proteínas no colágenas se pueden clasificar en cuatro grupos: proteínas que contienen γ -carboxiglutamato, proteoglucanos, glicoproteínas y pequeños ligandos de unión a integrinas (Tronci, 2019).

La MEC es complejo microambiente dinámico con propiedades mecánicas y bioquímicas reguladas con precisión. En el hueso, la MEC participa en la regulación de la adhesión celular, la proliferación y las respuestas a los factores de crecimiento, la diferenciación y, en última instancia, aporta las características funcionales del hueso maduro. La MEC puede inducir la formación de hueso nuevo por células de linaje de osteoblástico, células troncales, osteoblastos y osteocitos, y la remodelación de hueso por los osteoclastos (Mansour *et al.* 2017) (Porzionato *et al.* 2018).

En la actualidad, el empleo de tejidos y órganos descelularizados (xenogénicos y alogénicos) son aprobados por la FDA para su uso como reemplazos de órganos y tejidos en humanos. Sin embargo, debido a la complejidad del tejido óseo, se requiere un procesamiento diferente para mantener su estructura, composición, función y biodisponibilidad de los factores de crecimiento. Los procesamientos que se llevan a cabo en la mayoría de los andamios comerciales es la descelularización (Chen *et al.* 2021) y en algunos casos la desmineralización (Chen B. L., 2007). También se ha extraído la colágena de la MEC y mediante diversas técnicas de fabricación se han obtenido andamios de colágena ya sea sola o combinada con otro material. Sin embargo, analizando la gran variedad de materiales comerciales y la evidencia reportada por diversos autores se han encontrado deficiencias asociadas a las propiedades mecánicas, biológicas, estructurales que resultan en repercusiones clínicas que impactan principalmente en el grado de reparación ósea en los materiales biodegradables y en la osteointegración de los materiales no biodegradables.

Actualmente para su uso clínico no hay andamios derivados de hueso bovino descelularizado, desmineralizado y con hidrólisis de la proteína colágena con la posibilidad de utilizar la estructura nativa de la matriz extracelular ósea (Chen *et al.* 2018). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, hay una gran cantidad de estudios en donde se extrae la proteína colágena de la matriz extracelular ósea (Liu S., 2015) (Offeddu G.S., 2015) (Li *et al.* 2018), se purifica y por diferentes técnicas de fabricación se obtienen andamios por medio de tratamientos físicos o agentes químicos para lograr el entrecruzamiento intermolecular del colágena, modificando así las propiedades mecánicas del andamio (Yoshioka and Goissis, 2008).

La matriz extracelular ósea desmineralizada puede retener sus propiedades osteoinductivas y osteoconductoras como se demostró cuando se implantó matriz ósea desmineralizada de manera subdérmica en un modelo animal en el que se observó la formación ectópica de hueso. (Urist, 1973), sin embargo, la mayoría de los estudios actuales están enfocados en obtener nuevos materiales por diferentes métodos de

biofabricación y manufactura aditiva. Aunque el rápido desarrollo tanto de la ingeniería de tejidos como de la medicina regenerativa ósea, han aprovechado el potencial osteoinductivo y osteoconductor de los andamios basados en la MEC atrayendo cada vez mayor atención a los métodos para preservar las propiedades mecánicas, bioquímicas y biológicas de la MEC ósea (Mansour *et al.* 2017) (Tronci, 2019).

La principal ventaja de la MEC usada como biomaterial es que permite la llamada remodelación constructiva (Badylak, 2007), es decir, soporta y fomenta la formación de tejido específico en el sitio de implantación en lugar de formar tejido cicatricial. Sin embargo, el resultado clínico y funcional de los andamios derivados de la MEC dependen de varios factores, como la retención de factores de crecimiento dentro de la MEC, su topología superficial, propiedades físicas, químicas, mecánicas, inmunológicas y las señales microambientales ejercidas sobre las células.

Los andamios basados en el uso matriz extracelular ósea desmineralizada para la ingeniería de tejido óseo se pueden dividir en dos tipos, los andamios derivados de MEC modificados con biomateriales y los andamios derivados de MEC descelularizada (Tronci, 2019). Para fines de esta investigación nos centraremos en los andamios derivados de la MEC descelularizada.

Métodos de obtención de andamios derivados de la matriz extracelular ósea.

Descelularización

La descelularización de órganos y tejidos es el proceso de eliminar células, material genético y determinantes antigénicos preservando únicamente a los componentes de la MEC como factores de crecimiento, glucosaminoglucanos, colágena, proteínas no colágenas, así como preservar sus propiedades estructurales y mecánicas (Badylak, Freytes, and Gilbert 2009; Badylak, Taylor, and Uygun 2011; Crapo, Gilbert, and Badylak 2011; Gilbert, Sellaro, and Badylak 2006) (Tronci 2019) (Damania *et al.* 2018). Las técnicas de descelularización se categorizan en 4 grupos (Keane, Swinehart, and Badylak 2015) (Moharamzadeh 2017):

1. Métodos físicos que eliminan células. Entre estos se encuentran los ciclos de congelación-descongelación, agitación mecánica, aplicación directa de fuerza o presión y electroporación.
2. Métodos químicos que utilizan reactivos que se emplean solos o en combinación con otros para mejorar o complementar su mecanismo de acción. Se pueden emplear ácidos y bases, soluciones hipotónicas e hipertónicas, detergentes como Triton X-100, Triton X-200, dodecil sulfato de sodio (SDS), desoxicolato de sodio, sulfobetaína-10 y -16, y solventes tales como alcoholes, acetona y tributil fosfato.
3. Agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El EDTA se une a calcio, que es un componente necesario para las interacciones proteína-proteína como en las uniones intercelulares y en las uniones célula-MEC
4. Enzimas que son utilizadas para degradar los enlaces e interacciones entre ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes celulares.

La elección de los métodos de descelularización es muy importante, ya que de acuerdo con el tipo de técnica o reactivos empleados, los tiempos y concentraciones usadas la microestructura y la composición de la MEC puede ser alterada o dañada, resultando en una modificación de las propiedades físicas, químicas, biológicas y mecánicas del producto final. Sin embargo, hay 2 factores cruciales de los que depende la eficacia de la descelularización en un órgano o tejido: la metodología empleada y el tipo de tejido u órgano (Crapo, Gilbert, and Badylak 2011). Si bien no existe un consenso universal para los criterios de descelularización, se han propuesto tres criterios relativamente estrictos que indican que un tejido o un órgano ha sido descelularizado: (i) el tejido debe tener <50 ng de ácido desoxirribonucleico bicatenario (ADNs) por mg de peso seco del tejido u órgano, (ii) fragmentos de ADN <200 pb de longitud, y (iii) no tener material nuclear visible en cortes histológico teñidos con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o hematoxilina (H&E) (Faulk, 2014). Es necesario hacer notar que la tinción con DAPI aumenta su fluorescencia ~ 20 veces al unirse a las regiones ricas en adenina y timina (A-T) del ADN, por lo que la presencia o ausencia de coloración azul es un indicador de la presencia o ausencia de ADN (Zhang *et al.* 2022)

Después de la descelularización, los órganos y tejidos generalmente se observan blancos o translúcidos. La descelularización da como resultado una MEC libre de células, a la que también se le ha denominado “matriz acelular” o “desvitalizada”. Esta MEC constituye un andamio biológico acelular tridimensional (3-D), en el que posteriormente se pueden sembrar células parenquimatosas funcionales o con células progenitoras previamente caracterizadas (Damania *et al.* 2018).

El empleo de tejidos y órganos descelularizados (xenogénicos y alogénicos) ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para uso en humanos con el objeto de reemplazar varios órganos y tejidos, entre ellos el hueso (Tabla 1). Las matrices descelularizadas de órganos y tejidos, deben retener la estructura, composición y las señales que no están disponibles en otros andamios sintéticos, incluidas la presencia de factores de crecimiento, las glucoproteínas que dirigen la diferenciación y la adhesión celular (Taylor, 2015).

En el caso específico del hueso, debido a la complejidad del tejido óseo, se han estudiado diversos protocolos, y combinaciones de ellos ya que se requieren otros pasos en el procesamiento para mantener su estructura, composición, función y biodisponibilidad de los factores de crecimiento, disminuir la probabilidad de granuloma de cuerpo extraño y favorecer la tasa de degradación inversamente proporcional a la formación de hueso, de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en diferentes trabajos previos (Amiryaghoubi *et al.* 2020)(Abedin, 2018)(Hwang *et al.* 2017)(Nishikimi *et al.* 2017), hemos propuesto:

- 1) desmineralización para eliminar la fase mineral
- 2) hidrólisis de la colágena para disminuir la probabilidad de granuloma de cuerpo extraño y respuesta inmunogénica y favorecer la tasa de degradación inversamente proporcional a la formación de hueso.

PRODUCTO	COMPOSICIÓN	FASE CLÍNICA	COMPAÑÍA COMERCIALIZADORA
DBX	Matriz ósea desmineralizada en un vehículo de hialuronato de sodio.	Aprobada en 2000 por la FDA.	Neucoll (Cambell, CA, USA).
COLLAGRAFT	65% de hidroxia apatita, 35% de fosfato tricálcico y colágena bovina.	Aprobada en 2001 por la FDA.	Tutogen Medicals (Clifton, NJ, USA).
TUTOPLAST®	Aloinjerto.	Aprobada en 2001 por la FDA.	Medtronic (Minneapolis, MN, USA).
INFUSE®BONE GRAFT	Espónja de colágena reabsorbible enbebida en proteína morfogenética ósea 2 (BMP 2).	Aprobada en 2002 por la FDA.	IsoTis OrthoBiologics, Inc. (Irvine, CA, USA).
HEALOS®	Matriz extracelular de colágena entrecruzada y mineralizada.	Aprobada en 2002 por la FDA.	DePuy International Ltd (St Anthony's Roads, UK).
INDUCTOs®	Espónja de colágena bovina proteína morfogenética humana ósea 2 (hBMP 2).	Aprobada en 2004 por la FDA.	Wyeth Pharmaceuticals (New Lane, Havant, Hants, UK).
ALLOMATRIX	Matriz ósea desmineralizada, chips de hueso esponjoso en un vehículo de sulfato de calcio.	Aprobada en 2004 por la FDA.	Wright Medical Group (Arlington, TN, USA).
ORTHOBLAST®II	Matriz ósea desmineralizada.	Aprobada en 2005 por la FDA.	IsoTis OrthoBiologics, Inc. (Irvine, CA, USA).
GRAFTON	Fibras de matriz ósea desmineralizada en un vehículo de glicerol.	Aprobada en 2005 por la FDA.	Osteotech (Eatontown, NJ, USA).
OSTEORIL®	Partículas de matriz ósea desmineralizada en un vehículo de colágena porcina.	Aprobada en 2005 por la FDA.	Regeneration Technology (Alachua, FL, USA).
INTERGRO®DBM	Aloinjerto de matriz ósea desmineralizada en un vehículo lipídico.	Aprobada en 2005 por la FDA.	Interpore Cross International (Irvine, CA, USA).
NUBONE™	Aloinjerto de matriz ósea desmineralizada en un vehículo de gelatina de hueso cortical.	Aprobada en 2007 por la FDA.	Globus Medical, Inc. (Audubon, PA, USA)
ORAGRAFT®	Aloinjerto de hueso desmineralizado por el método de congelamiento-secado.	Aprobada en 2008 por la FDA.	LifeNet Health, Inc. (Virginia Beach, VA, USA).
PRO-STIM SUSTITUTO INDUCTIVO INYECTABLE	Sulfato de calcio y fosfato de calcio con matriz ósea desmineralizada osteoinductiva osteoconductiva.	Aprobada en 2009 por la FDA.	Wright Medical Group (Arlington, TN, USA).
EQUIVA BONE®	Matriz ósea desmineralizada osteoinductiva con fosfato de calcio nanocrystalino.	Aprobada en 2009 por la FDA.	ETEX Corporation (Cambridge, MA, USA).
OP-1™	Combinación de proteína osteogénica 1 en un vehículo de colágena.	Aprobada en 2010 por la FDA.	Stryker (Kalamazoo, MI, USA).
ACCELL TBM	Matriz ósea desmineralizada.	Aprobada en 2010 por la FDA.	Integra Life Sciences Holdings corporation (Plainsboro, NJ, USA).

TABLA 1

Andamios aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para uso en humanos, para el reemplazo de hueso. Traducido de Miron, R. J., & Zhang, Y. F. (2012). Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of dental research*, 91(8), 736-744.

Desmineralización ósea

La matriz ósea extracelular desmineralizada (por sus siglas en inglés, DBM) es uno de los materiales osteoinductores más utilizados y puede servir como andamio tridimensional para favorecer el crecimiento de nuevo tejido óseo, si conserva de manera adecuada los componentes orgánicos de la matriz ósea extracelular (Urist *et al.* 1973) (Umebayashi *et al.* 2020). Por lo anterior, es de suma importancia procesar a la MEC ósea de tal manera que retenga factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Así, si se conserva la estructura y los componentes anteriormente mencionados, la matriz ósea desmineralizada (DBM) es osteoinductiva y osteoconductiva.

La DBM obtenida de aloinjertos o xenoinjertos se procesa con mayor frecuencia en ácido clorhídrico o algún otro ácido o quelante para su desmineralización, idealmente, en este proceso se debe eliminar el calcio y el fosfato, pero conservar la matriz extracelular orgánica, que consiste principalmente en colágena tipo I, proteínas no colágenas y factores de crecimiento (Goodyear and Aspden 2012).

La ausencia de minerales en la matriz ósea desmineralizada le proporciona la ventaja de que pueda mineralizarse directamente por acción de los osteoblastos sin someterse a remodelación, ya que los injertos o materiales mineralizados se someten a un proceso de sustitución progresiva y osteointegración incompleta. Por lo tanto la matriz ósea desmineralizada proporciona un andamio que facilita la liberación endógena de sus componentes en el sitio del defecto óseo crítico y al colocarse quirúrgicamente aportará las prestaciones funcionales y estructurales necesarias para inducir la formación de hueso y acelerar el proceso de reparación en un defecto óseo crítico.

En la actualidad hay una gran variedad de formulaciones y presentaciones de DBM disponibles comercialmente para su uso clínico, sin embargo no se ha conseguido estandarizar una metodología reproducible y accesible que preserve propiedades osteoinductivas, osteoconductivas y osteogénicas de la DBM y por lo tanto tampoco se ha obtenido un material que pueda considerarse como ideal.

Hidrólisis de la proteína colágena

La colágena tipo I es una proteína triple-hélice dextrógira formada por tres cadenas alfa. Cada cadena alfa tiene una glicina cada tres aminoácidos siguiendo un patrón bien definido que se conoce como Gly-X-Y, donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido, pero con frecuencia son prolina, lisina y sus derivados hidroxilados de hidroxilisina e hidroxiprolina (Komatsu *et al.* 2018; Oliveira *et al.* 2013) (Egorikhina *et al.* 2021). Por otra parte, hay conflicto de opiniones de los posibles respuestas inmunes indeseados sobre la α -galactosa (1,3)-galactosa (α -gal) que es un epítipo disacárido terminal, que está presente en tejidos xenogénicos, pero no en humanos. (Naso *et al.* 2012) Por otra parte, hay reportes de que la colágena xenogénica pueda dar lugar a respuestas inflamatorias indeseables. Los estudios sugieren que las respuestas inmune e inflamatoria están asociadas con el hecho de que después de la descelularización de órganos y tejidos se fijan con glutaraldehído o son tratados con entrecruzantes con objeto de mejorar sus propiedades mecánicas.) (Bayrak *et al.* 2010; You *et al.* 2018; Brooker, C.,

& Tronci,2022) La respuesta inmunológica estimula que los biomateriales empleados se calcifiquen, así que la aplicación de andamios xenogénicos tal vez no implica una desventaja clínica. (Wong and Griffiths 2014).

Es necesario observar que no hay un consenso acerca de si la colágena tipo I es causante de una respuesta inmune. Varios estudios apoyan que las propiedades de la colágena tipo I nativa son muy diferentes que las propiedades de la colágena tipo I hidrolizada. La colágena tipo I hidrolizada es más hidrofílica, se ha observado que induce una baja o nula inmunidad, no causa respuesta alérgica, se degrada más rápido y hay mayor bioactividad porque se exponen regiones crípticas de la triple hélice como los motivos RGD (Hoyos-Nogues *et al.* 2019; Hedhammar 2019; Qiu *et al.* 2022). La colágena tipo I puede tener un cambio conformacional irreversible o hidrolizarse en componentes de relativo bajo peso molecular y el grado de hidrólisis dependerá del tiempo y concentración del agente desnaturalizante al que fue sometido (Brooker, C., & Tronci,2022).

La colágena se usa actualmente para hidrogeles o andamios a base de colágena. La colágena proporciona una excelente matriz para muchos tipos de células y permite el cultivo celular en 3D utilizando un hidrogel.

Sin embargo, el uso de la colágena solo para la ingeniería de tejido óseo puede no ser apropiado. Por lo tanto, es necesario modificar el colágeno (Oh *et al.* 2021) sin afectar otras propiedades deseables de la MEC ósea orgánica.

Tomando en cuenta las principales ventajas y desventajas de los injertos óseos que aún son el estándar de oro clínico, consideramos que era necesario aprovechar las propiedades de la matriz extracelular y mitigar sus desventajas para la obtención de andamios osteoconductivos, osteoinductivos y osteogénicos al sembrar hWJ-MSCs. Este protocolo de 3 fases, que incluyó:

- 1) descelularización para eliminar células y determinantes inmunogénicos del hueso bovino.
- 2) desmineralización para eliminar la fase mineral del hueso bovino.
- 3) hidrólisis de la proteína de colágena para disminuir la probabilidad de granuloma de cuerpo extraño y respuesta inmunogénica y favorecer la tasa de degradación inversamente proporcional a la formación de hueso.

Células

La ingeniería de tejidos y medicina regenerativa requieren células vivas capaces de formar o recrear los órganos y tejidos funcionales. Algunos enfoques de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa se basan en la regeneración guiada de tejidos utilizando biomateriales que sirvan como plataformas para el crecimiento de células autólogas o alogénicas. Otros enfoques se basan en implantar las células hematopoyéticas de la médula ósea tienen la capacidad de producir factores proinflamatorios y de crecimiento, incluidos TNF α , IL-1 β , IL-12 y GM-CSF, que estimulan la proliferación y diferenciación de células troncales y progenitoras normales en defectos óseos críticos (R. Pelayo, 2015).

A medida que comprendamos los mecanismos genéticos normales de la morfogénesis, desarrollo, curación de heridas, el comportamiento celular y la interacción con el microambiente, podremos usar estos conocimientos para el diseño de tejidos vivos y la implementación de técnicas de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, por lo tanto aumentar el éxito clínico de los tratamientos.

Células Troncales

La definición de las células troncales se hace de acuerdo a los criterios funcionales, debido a que no hay características morfológicas que permitan distinguirlas del resto de células del órgano o tejido del que provienen. Las células troncales son células inmaduras, no diferenciadas con alta capacidad de autorreplicación y capaces de diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas. Existen muchos tipos de células troncales que difieren tanto en su grado de diferenciación como en su capacidad de autorrenovación (Figura 5). Las células de gametos sexuales que son los óvulos o espermatozoides, son células troncales que desarrollarán en todos tejidos embrionarios y extraembrionarios después de la fertilización. Las células embrionarias derivadas de un embrión o feto humano son células troncales también con pleno potencial de diferenciación. Sin embargo, las células troncales adultas son células parcialmente diferenciadas que se encuentran entre células especializadas o diferenciadas en un tejido u órgano. De acuerdo con investigaciones actuales, las células troncales adultas parecen tener una capacidad más restringida para producir diferentes tipos de células y autorrenovarse en comparación con las células troncales embrionarias (R. Pelayo, 2015).

Por otra parte, los hallazgos y alcances en las investigaciones en el campo de las células troncales durante las últimas dos décadas han impulsado el desarrollo de la medicina regenerativa, para la reparación, sustitución o regeneración de tejidos u órganos, para restaurar funciones biológicas alteradas por diversas causas, incluyendo malformaciones congénitas, enfermedades o traumatismos (Lanza, 2020).

La adición de células vivas a un andamio, con el objetivo de mejorar una función o inducir una nueva. Ha emergido como una terapia prometedora debido a que las células empleadas pueden manipularse *ex vivo*, tanto a nivel celular como molecular para mejorar su eficiencia. Sin lugar a duda, las células troncales juegan un papel preponderante en la terapia celular, en particular las células troncales hematopoyéticas empleadas en los procedimientos clínicos. En la actualidad las células troncales mesenquimales (MSCs, del inglés Mesenchymal Stem Cells) se emplean con mayor frecuencia en las áreas clínicas de ortopedia y como inmunomoduladores en el trasplante de células hematopoyéticas (Lanza, 2020).

El potencial de la ingeniería de tejidos está basado en la plasticidad de las células troncales y la capacidad de manipulación de las células *in vitro*. Las evidencias obtenidas actualmente presentan un panorama alentador para el futuro empleo clínico de las células troncales para solucionar problemas actuales relacionados con la regeneración de diversos tejidos (Lanza, 2020). La expresión de CD 90 (Thy-1) este marcador de superficie es una proteína de membrana unida a glicosil-fosfatidilinositol (GPI) de 25–30 kDa y se ha demostrado previamente que está asociado con células osteoprogenitoras por lo que las células CD90⁺ son más capaces de formar hueso tanto *in vitro* como *in vivo* (Aggarwal *et al.* 2005).

La expresión de CD105 (endoglina) están constantemente presente en una alta proporción de las MSC y está ausente en las células hematopoyéticas, se ha demostrado previamente que las células CD105^{low} son multipotentes *in vitro* y exhiben la capacidad de formar hueso *in vivo* (Aslan *et al.* 2006; Cabrera-Perez *et al.* 2019).

La expresión de CD73 (5'ecto-nucleotidasa) se atribuye a un mayor potencial de diferenciación osteogénica e *in vitro* e *in vivo*, por lo que se relaciona a una subpoblación de MSC CD73⁺ como capaces de promover la reparación de fracturas (Ansari *et al.* 2018). También se ha reportado que las hWJMSC ejercen un efecto inmunosupresor al inhibir la proliferación y la función de las células inmunitarias, y son inmunoprivilegiadas ya que expresan poco MHC-II y por lo tanto hay una baja expresión de HLA-DR (Cabrera-Perez *et al.* 2019).

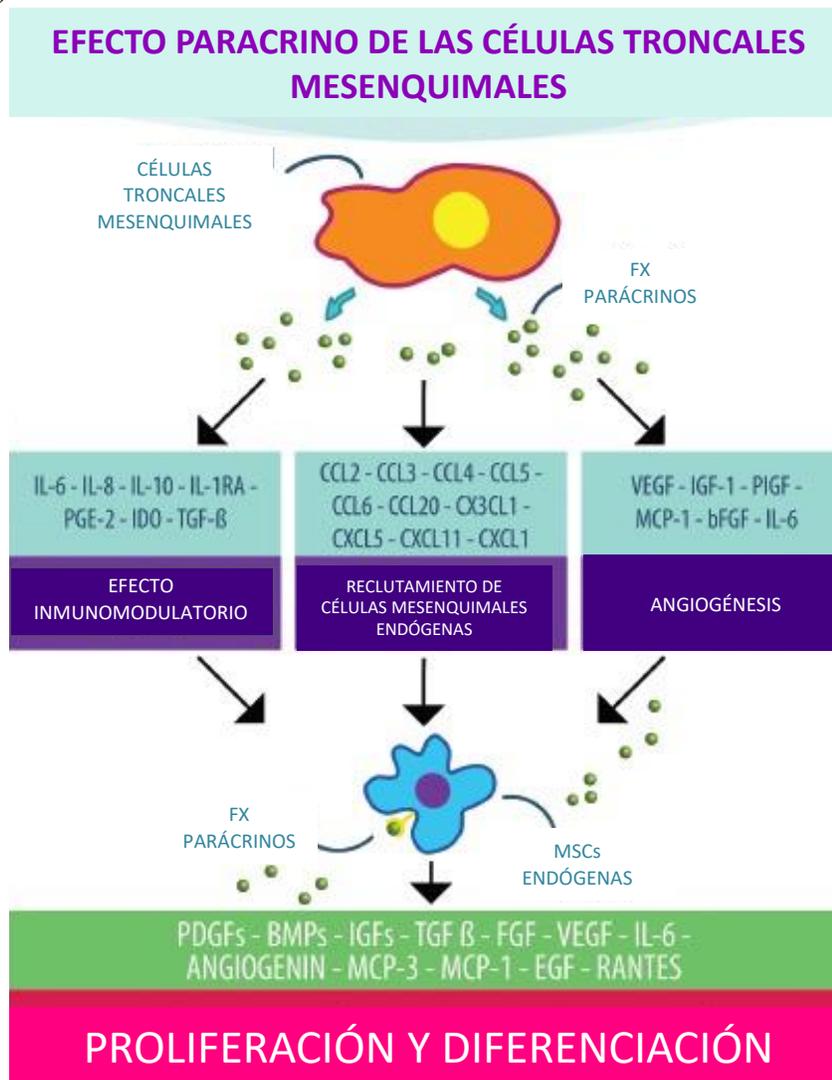


FIGURA 5

Efecto paracrina de las células troncales mesenquimales. Traducido de Chaparro, O., & Linero, I. (2016). Regenerative medicine: a new paradigm in bone regeneration. *Adv Techn Bone Regen*, 1, 253-274.

Antecedentes

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa junto con la medicina translacional se han enfocado a la investigación del tejido musculo esquelético, el hueso y el cartílago de manera exhaustiva. Se han estudiado experimentalmente y/o clínicamente varios materiales, entre los que hay materiales sintéticos, naturales, biodegradables, reabsorbibles, así como una infinidad de técnicas de síntesis, diseños y presentaciones; sin embargo, aún no se encuentra un material o técnica que pueda considerarse el “estándar de oro clínico” como alternativa al injerto óseo autólogo. Por ejemplo, en 2005, Mauney *et al.* obtuvieron andamios derivados de hueso bovino, desmineralizados con porcentajes de contenido de calcio de $19.8 \pm 2.4\%$, $11.3 \pm 2.5\%$ y $0.3 \pm 0.5\%$ por gramo de peso del andamio seco. Para su obtención se empleó ácido clorhídrico a una concentración 0.6 N con una proporción de 50 ml por gramo de hueso. El proceso de desmineralización varió de 15 minutos a 12 horas. De esta manera, se obtuvieron andamios de 8 cm que fueron sembrados con 2.5×10^6 células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea. Los andamios sembrados fueron mantenidos en cultivo dinámico en matraces giratorios y en cultivo estático con ayuda de sistemas transwell. Los objetivos de ese estudio eran evaluar la capacidad de diferenciación osteogénica *in vitro* de las células troncales de la médula ósea y también evaluar su capacidad de formación ósea *in vivo* implantando los andamios con las células en sitios subdérmicos en ratones atímicos. Los resultados sólo mostraron el porcentaje de calcio de los andamios obtenidos, sin evaluar el fosfato, que es otro indicador importante del grado de mineralización. Por otro lado, emplearon sistemas transwell para evitar que las células se adhirieran al fondo del pozo de cultivo y favorecer que las células sólo se adhirieran al andamio. Asimismo, con objeto de determinar el número de células adheridas al andamio, utilizaron como indicador la actividad metabólica de las células, que de ninguna manera permite evaluar con precisión el número de células en cultivo 3D. Además, reportaron que los valores de factores solubles en los 3 casos son similares, sin embargo, observaron que la capacidad de diferenciación osteogénica *in vitro* y formación ósea *in vivo* es mejor en los andamios parcialmente desmineralizados, debido a la presencia de factores osteogénicos de la matriz extracelular ósea. Finalmente, cabe mencionar que, de todos los resultados obtenidos, solo muestran una figura de los 3 cortes histológicos teñidos con H&E, lo cual podría ser insuficiente para los objetivos planteados inicialmente en este estudio.

En otro estudio, Chamieh *et al.* (2016) fabricaron hidrogeles de colágena tipo I a una densidad de 10% p/v sembrados con células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental de molares de ratas Wistar. El objetivo del estudio fue evaluar los efectos osteogénicos de los andamios de hidrogeles de colágena tipo I sembrados con células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental con objeto de evaluar la regeneración ósea en un modelo de defecto óseo crítico en las calvarias de las ratas. Observaron que después de 35 días, los defectos de tamaño crítico en las calvarias habían disminuido tanto en área como en grosor, pero sólo en los casos donde sembraron células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental y no en los andamios que no tenían células. Esta evaluación se realizó mediante microtomografía y análisis histológico, atribuyendo estos resultados a que en los andamios de colágena densa tipo I reduce su rigidez de 55 a 30% en dos semanas después de agregar células. Finalmente, sugirieron el uso clínico del andamio en combinación con las células troncales mesenquimales

derivadas de la pulpa dental. Sin embargo, en este estudio no hay suficiente evidencia que demuestre que lograron una reparación ósea total ni una aproximación de tiempo en el que podrían obtenerse la reparación total de los defectos críticos.

En una revisión sistemática reciente realizada por Ansari *et al.* (2018) en la que analizaron 18 artículos que evaluaron el potencial osteogénico de las células humanas troncales de gelatina de Wharton (hWJ-MSC) en condiciones clínicas. De estos artículos, 14 fueron estudios *in vitro*, 2 fueron estudios *in vivo* y 2 fueron estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. En 6 de estos 18 estudios se fabricaron andamios que se usaron en combinación con hWJ-MSC, de los cuales en 4 utilizaron un medio de cultivo inductor de la diferenciación y sólo en 2 emplearon andamios con propiedades bioactivas y solo en 1 la combinación de las propiedades bioactivas del andamio y plasma rico en plaquetas. Los resultados obtenidos fueron diversos: algunos lograron la formación de hueso a 12 semanas, acelerar el tiempo de recuperación en pseudoartrosis, y un aumento en la expresión de genes asociados con la mineralización, con un incremento en la mineralización *in vitro* y potencial osteogénico, entre otros. La revisión demostró que las hWJ-MSC son capaces de diferenciarse en osteoblastos, por lo que son una excelente alternativa a las células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea para su aplicación clínica ya que también se ha demostrado su capacidad inmunomoduladora (Hendijani, 2017).

Armstrong *et al.* 2020 analizaron la situación actual de la ingeniería de tejidos y la medicina translacional y sugirieron 2 desafíos clave que deben abordarse para tener avances en esta área; 1) después de realizar los estudios de prueba de concepto de materiales tanto naturales como sintéticos en dimensiones arbitrarias, se lleven a cabo en dimensiones estructurales nativas y que los tipos de células empleadas den como resultado tejidos maduros multicelulares; 2) utilizar materiales y protocolos que admitan la manipulación interdisciplinaria sin afectar otros aspectos del tejido que se plantea obtener.

Debido a que en muchas ocasiones se requiere el uso de materiales con propiedades definidas como: ciertos niveles de transparencia óptica, propiedades mecánicas, presencia de factores de crecimiento, entre otros. Las estrategias de diseño y obtención se deben basar en: (i) un material personalizado, diseñado y sintetizado con propiedades específicas; o (ii) la elección de un material existente que tenga propiedades compatibles dentro de un espacio de parámetros determinados.

Si bien, un material diseñado experimentalmente o seleccionado de acuerdo con propiedades ya evaluadas puede usarse para favorecer la organización de las características estructurales, este beneficio no debe ser a expensas de las propiedades biológicas, físicas o mecánicas requeridas para apoyar la viabilidad celular, la producción de matriz extracelular y la diferenciación, por mencionar algunas. Idealmente, un protocolo de ingeniería de tejidos que sea reconocido como el “estándar de oro académico o clínico” se utilizaría únicamente con cambios al procedimiento establecido con la supervisión de campos interdisciplinarios.

Justificación

Durante varias décadas la investigación de la reparación de defectos óseos se ha enfocado en desarrollar sustitutos óseos capaces de imitar tanto la composición como las propiedades mecánicas de la matriz extracelular ósea, sin embargo, un andamio ideal para la reparación ósea no solo debe imitar esas características, sino aportar un microambiente dinámico, osteoconductor, osteoinductor y osteogénico como el que solo aporta la matriz extracelular ósea.

Una alternativa a las deficiencias de los andamios disponibles actualmente puede ser la obtención de un andamio a partir de matriz extracelular descelularizada, ya que previamente se ha logrado con éxito la reparación de otros órganos y tejidos, sin embargo, al ser la matriz extracelular ósea más compleja, requiere tanto desmineralizarla como descelularizarla, sin embargo, los métodos de descelularización y desmineralización usados actualmente son demasiado agresivos y dañan las propiedades deseables de la matriz extracelular ósea.

Por esta razón, es importante obtener andamios a partir de hueso esponjoso bovino mediante métodos que permitan preservar las propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas de la matriz extracelular ósea y por lo tanto puedan usarse para la reparación de defectos óseos.

Objetivos

Objetivo general

Obtener y caracterizar un andamio a partir de hueso esponjoso bovino que conserve las propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y que al sembrar células mesenquimales de cordón umbilical humano (hWJ-MSCs) tenga potencial osteogénico *in vitro*.

Objetivos específicos

- Evaluar la descelularización, desmineralización de los andamios obtenidos a partir de hueso esponjoso bovino.
- Caracterizar la estructura, morfología, diámetro mayor de poro, composición química, capacidad de absorción y tiempo de degradación de los andamios obtenidos a partir de hueso esponjoso bovino.
- Aislar hWJ-MSCs y caracterizar su inmunofenotipo.
- Evaluar citocompatibilidad, adhesión celular y la capacidad de mineralización de los andamios obtenidos a partir de hueso esponjoso bovino en los cuales cultivamos hWJ-MSCs.

Metodología

Materiales

Muestras biológicas

Bloques de hueso cortical con dimensiones de 1 cm³, obtenidos de fémur bovino (18-24 meses), de un matadero en la Ciudad de México.

Andamios comerciales de hueso esponjoso autólogo clase III Biograft®

3 cordones umbilicales, los cuales se obtuvieron mediante cesárea de un hospital público en la Ciudad de México. Los donantes firmaron previamente el consentimiento informado, y realizamos la recolección de acuerdo con las pautas establecidas por del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Reactivos

Solución de hipoclorito de sodio al 5% (NaOCl) (Los patitos, Grupo Dimex, México, Ciudad de México) Solución de metanol (N°. de catálogo 650188), solución de cloroformo (N°. de catálogo C7559), dodecil sulfato de sodio (SDS) (N°. de catálogo L3771), solución Tritón 100X 1 % (N°. de catálogo T8787), solución de ácido clorhídrico al 37% (N°. de catálogo 320331), hidróxido de sodio (NaOH) (N°. de catálogo 38227), solución de paraformaldehído al 4% (N°. de catálogo 1004969010), 2- [4- (2-hidroxi-etil) piperazina Ácido -1-il] etanosulfónico (HEPES) (N°. de catálogo H4034), colagenasa tipo I (N°. de catálogo. SCR103) y 2- (4- aminofenil) -1H-indol-6-carboxamida (DAPI) (N°. de catálogo 268298), tinción tricrómica de Masson (Catálogo #. HT15) todos comprados de Sigma Aldrich Inc., Saint Louis, Missouri, EE. UU. Medio de cultivo Medio de Eagle modificado por Dulbecco / Mezcla de nutrientes F-12 Jamón (DMEM-F12) (N°. de catálogo L0090), suero fetal bovino (FBS) (N°. de catálogo S1650), penicilina-estreptomina (N°. de catálogo L0018-100) todos comprado a Bio West Inc., Rosenberg, Texas, EE. UU. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (n°. de catálogo. 324506), solución de lisozima (de clara de huevo) (n° de catálogo 105281) Tinción von Kossa (N° de catálogo 100362) todos comprados en Merck Millipore Inc., Burlington, Massachusetts, EE. UU. Anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos: Per CP / Cy5.5 anti-human105 (Catálogo # 323216), FITC antihumano CD 90 (N°. de catálogo 328108), APC antihumano CD 73 (N°. de catálogo 344006), PE anti- CD 34 humano (N°. de catálogo 343606), CD 45 antihumano de PE (N°. de catálogo 368510), CD19 antihumano de PE (N°. de catálogo 363004), CD 11b antihumano de PE (N°. de catálogo 338808), PE / Cy7 antihumano HLA-ABC, PE antihumano HLA-DR (N°. de catálogo 327008) todos comprados en BD Biosciences, San José, California, EE. UU. Anticuerpo policlonal anti CD51 / ITGAV (N°. de catálogo ALX-210-537-R100) Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE. UU. Kit de viabilidad / citotoxicidad para células de mamíferos LIVE / DEADTM Thermo Fisher Inc., Waltham, Massachusetts, EE. UU., Polvo de colágena bovina tipo I comprado de NeoCell Nature's products Inc, de Nutranext business, LLC, Sunrise, Florida, EE. UU., Trypsin / Etilenediamina tetraacético acid (EDTA) 0.05% (N°. de catálogo 15400054) todos comprados de GibcoTM Thermo Fisher Inc., Waltham, Massachusetts, EE. UU.

Equipos

Baño maría con agitación (modelo SWBR17, MRC lab Ltd., Ha-Gavish, Holon, Israel), Incubadora de CO₂ (modelo NU-5700, NuAire, Inc., Plymouth, Minnesota, EE. UU.), Congelador de laboratorio de ultrabaja temperatura (modelo DV039M-5ID Merit, Jhonghe Dist., Nueva ciudad de Taipéi, Taiwán), Liofilizadora (modelo SC-10N, Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd., Ningbo, Zhejiang, China), Esterilizador mediante ozono/UV (modelo UV Ozone Cleaner ProCleaner™ Plus, BioForce Nanosciences, Inc., Virginia, EE. UU.), Microscopio SEM con un sistema de energía dispersiva (SEM/EDS) (modelo 5600LV, Jeol Ltd., Akishima, Tokio, Japón), Microscopio óptico Olympus I (modelo X50, Olympus Inc., Tokio, Japón), Microscopio confocal Leica (modelo TCS

SP8, Leica Inc., Wetzlar, Alemania), Raman con microscopio confocal acoplado (modelo alpha300 R, WITec Inc., Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Ulm, Alemania), Espectrómetro equipado con un cristal de diamante de reflectancia total atenuada (FT-IR/ATR) (modelo Nicolet iS50R, Thermo Scientific, Inc., de Waltham, Massachusetts, EE. UU.), Equipo Microindentador Femto Tools con un sensor FT-S2 (modelo FT-MTA03, FemtoTools Inc., Buchs, Inner-Rhoden, Suiza), Gabinete de Bioseguridad Clase II (modelo IIA2-X, Eco Shell, Notre-Dame-de-Stanbridge, Québec, Canadá), Citómetro de flujo (FACSCalibur™, BD Biosciences, San José, California, EE. UU.).

Software

Image J (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland, EE. UU.), PeakFit (Systat Software Inc., San José, California, EE. UU.), Prism 7 (GraphPad, Inc., San Diego, California, EE. UU.). FlowJo™ (Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.).

Otros

Cubre objetos Rectangulares # 1 (Coring, Inc., Nueva York, EE. UU.), caja de Petri y placa de cultivo de 96 pozos (Biofil, Inc., YongHe Development Zone, Guangzhou, China). botellas de cultivo celular (Falcon®, Corning, Inc., Nueva York, EE. UU.).

Métodos

Limpieza de los bloques de hueso bovino

Se cortaron bloques frescos de hueso de fémur bovino desde la epífisis hasta la diáfisis. Se almacenaron los bloques de hueso bovino (1 x 1 x 1 cm) a -80 ° C hasta su uso; antes del procesamiento, para eliminar la sangre y los lípidos de los bloques de hueso bovino; primero, se lavaron con agua destilada hasta que eliminamos los restos de sangre, inmediatamente se mantuvieron en NaCl durante 24 horas en el baño maría en agitación constante a 100 rpm a 37 ° C, y finalmente se lavaron tres veces con PBS a 4 ° C.

Se eliminaron los lípidos de los bloques óseos de la siguiente manera; primero, se colocaron en 100 ml de solución 1: 1 de metanol-cloroformo, luego se dejaron en inmersión durante 24 horas a temperatura ambiente, inmediatamente se lavaron con agua destilada en tres ocasiones. Luego, se agregó agua destilada a 60 ° C, enseguida se esperó a que volvieran a temperatura ambiente durante 1 hora y, finalmente, se mantuvieron en la botella abierta en la campana extractora durante ese tiempo.

Obtención de andamios a partir de los bloques de hueso bovino mediante descelerización, desmineralización, e hidrólisis de la proteína de colágena

Debido a la complejidad de la composición del tejido óseo, implementamos un procesamiento para obtener los andamios de la matriz extracelular de hueso bovino descelerizado, desmineralizado y la proteína de colágeno hidrolizada Tabla 2.

1) Se eliminó todo el material celular y nuclear (determinantes antigénicos), se utilizaron los detergentes Dodecil sulfato de sodio (SDS) / Tritón X 100. Se colocaron 10 gramos de bloques de hueso bovino por 100 ml de solución SDS con Tritón X 100 al 1%, luego

se mantuvieron durante 24 horas a 37 ° C y en agitación constante en el baño maría, al final del proceso, se lavaron tres veces con PBS a 4 ° C.

2) Se desmineralizaron para eliminar la fase inorgánica del hueso, aumentar la biodisponibilidad de los factores de crecimiento y favorecer la degradación total del andamio, lo cual es extremadamente importante ya que queremos obtener un andamio biodegradable que favorezca la formación ósea inversamente proporcional a la degradación del andamio. Se desmineralizaron usando ácido clorhídrico (HCl), se usaron tres concentraciones diferentes 0.5 M, 0.250 M y 0.125 M. Se usaron estas concentraciones por cada 10 g de bloques de hueso bovino. Se mantuvieron en el baño maría en agitación constante a 100 rpm durante 24 horas a 37 ° C, se lavaron los bloques de hueso bovino con agua destilada y PBS a 4 ° C con la finalidad de eliminar el exceso de ácido, se pusieron en inmersión en solución de EDTA 0.5 M durante 2 horas a 4 ° C, y se lavaron con PBS a 4 ° C.

3) Finalmente, la hidrólisis alcalina matriz extracelular de hueso bovino descelularizada, desmineralizada, se realizó para exponer secuencias RGD y disminuir la probabilidad de granuloma a cuerpo extraño, se usó 100 ml de solución de NaOH a una concentración .1N por cada 10 g de bloques de hueso bovino. Se mantuvieron bajo agitación constante a 100 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente, y finalmente, se lavaron tres veces con PBS a 4°C.

En el futuro, nombramos la matriz extracelular de hueso bovino descelularizada, desmineralizada, en donde la proteína de colágena está hidrolizada y que se obtuvo a tres concentraciones diferentes de HCl como, andamio 0.5 M, andamio 0.25 M y andamio 0.125 M; en donde el nombre de cada uno hace referencia a la concentración de HCl que se usó; ya que es la única variación en el método de obtención de los andamios.

NOMBRE	DESCELULARIZACIÓN	DESMINERALIZACIÓN	HIDRÓLISIS DE LA COLÁGENA
Andamio 0.125	+	0.125 M de HCl por cada 10 g de hueso fresco.	+
Andamio 0.25	+	0.25 M de HCl por cada 10 g de hueso fresco.	+
Andamio 0.5	+	0.5 M de HCl por cada 10 g de hueso fresco.	+
* + Procedimiento igual para todos los andamios.			

TABLA 2

Procedimientos empleados para la obtención de los andamios

Secado y esterilización de andamios

Se secaron los andamios por sublimación para preservarlos a largo plazo; se usó una liofilizadora al vacío durante 24 horas, inmediatamente se esterilizaron los andamios con el esterilizador de ozono/UV durante 30 minutos y se almacenaron en paquetes herméticos hasta su uso.

Evaluación histológica de los andamios

Se determinó histológicamente tanto la efectividad de los métodos de obtención los andamios como las características histológicas de los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M. Se analizaron 9 andamios, tres de cada grupo y de lotes diferentes, para determinar los cambios en la estructura de los andamios de la matriz extracelular nativa.

Se analizaron con tinción tricrómica de Masson los cortes histológicos de los andamios 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M, y los cortes histológicos de bloques de hueso bovino sin procesar. Además, se analizaron los andamios de 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M y los bloques de hueso bovino sin procesamiento, y andamios comerciales para establecer como parámetro un material que cumple con los criterios específicos para su comercialización con la tinción 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); cada uno de los andamios se analizaron por triplicado. Se fijaron los andamios y los bloques de hueso bovino en una solución de paraformaldehído al 4% durante toda la noche, luego se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 10 µm de espesor; y finalmente, se tiñeron con tinción tricrómica de Masson y se agregó directamente DAPI a los andamios.125 M, 0.25 M y 0.5 M, a los bloques de hueso bovino sin procesar y a los andamios comerciales.

Se tomaron imágenes de los cortes histológicos con un aumento de 40x con el microscopio óptico y el microscopio confocal. Se analizaron las micrografías obtenidas para determinar la efectividad de los métodos de descelularización, la desmineralización, la presencia o ausencia de material celular o nuclear, la estructura de las trabéculas y la orientación de las fibras de colágena en los andamios.

Caracterización de andamios

Diámetro mayor de poro

Se determinaron las diferencias estructurales entre los andamios de 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, así como la estructura trabecular, la interconexión de poros y su diámetro mayor; este análisis se realizó mediante microscopía electrónica de barrido, se usó la técnica de electrones retro dispersados con una aceleración de voltaje de 15 kV y un aumento de 50x. Se analizaron los andamios de 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M, de 500 µm de grosor por triplicado cada grupo, se usaron andamios de lotes diferentes y los bloques de hueso bovino sin procesamiento también se usaron por triplicado.

Se colocaron los andamios y los bloques de hueso bovino a bajo vacío, se observó la morfología de la superficie y se obtuvo información sobre la forma, el tamaño y la distribución de los poros. Se observaron todos los andamios sin recubrimiento y, como control, se usaron los bloques de hueso bovino mediante la técnica de electrones retro dispersados a bajo vacío. Se midieron y se calcularon el promedio del tamaño de poro del hueso bovino y los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M; luego, se identificaron los posibles cambios en el tamaño de poro entre los andamios y el hueso bovino (control).

Se obtuvieron las imágenes mediante SEM, después se procesaron las imágenes digitales mediante el software Image J; se usaron como referencia los píxeles en la imagen y la proporción del diámetro de poro mayor y la barra de escala. Se examinaron 50 mediciones por grupo y se expresaron los resultados como la media + - desviación estándar y el valor P.

Microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDS)

Se analizaron la composición química de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M por microscopía SEM acoplado a un EDS; se analizaron los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, por triplicado 3 de lotes diferentes y también se usaron 3 bloques de hueso bovino sin procesar como control.

Se llevó a cabo análisis SEM / EDS a un voltaje de aceleración de 20 kV y una distancia de trabajo de 10 mm. Se colocaron los andamios y los bloques de hueso bovino a bajo vacío; luego, se analizaron con análisis puntual de EDS con tiempos de adquisición entre 10-30 s.

Se analizaron los espectros de cada muestra; se obtuvo el promedio de 3 espectros por grupo (n = 12), luego se identificaron la presencia o ausencia de picos asociados elementos que componen la matriz mineralizada del hueso bovino.

Espectroscopia Raman

Se determinó la composición química de los andamios de 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M por medio de espectroscopia Raman. Se compararon los espectros de los andamios con respecto a los que se obtuvieron de la colágena hidrolizada tipo I en polvo ya es el componente principal de la matriz extracelular ósea orgánica de la cual se obtuvieron los andamios.

Se seccionaron longitudinalmente los andamios de 1 cm³ con una hoja de bisturí para el análisis de las regiones internas del andamio, la colágena hidrolizada tipo I en polvo que se usó como control no requirió ninguna preparación previa.

Se registraron mediciones de espectros Raman de los andamios usando un equipo Raman acoplado con un microscopio confocal a 672 líneas / mm de rejilla y excitación de luz láser de 532 nm, que se originó a partir de un rayo láser incidente de láser verde Nd: YVO₄ con una potencia de 3,56 mW. Se colocaron los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, y la colágena hidrolizada tipo I en polvo sobre el vidrio del cubreobjetos para el análisis; se observaron con un objetivo 20x.

Se adquirieron espectros con 3s de tiempo de integración y 50 acumulaciones. Finalmente, se analizaron los espectros de cada muestra con Peak Fit, y se obtuvieron los promedios de 9 espectros por grupo (n = 36), luego se realizaron la asignación de bandas.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

FT-IR es una técnica complementaria a la espectroscopia Raman; se usó para confirmar la composición química de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M y la ausencia de residuos de los reactivos que se usaron durante el procesamiento. Se analizó la composición química de los andamios; como control, usamos la colágena hidrolizada tipo I en polvo, se analizó mediante la técnica espectroscópica FT-IR junto con el aditamento ATR por triplicado por cada grupo.

Se adquirieron los espectros infrarrojos con 32 escaneos, a una resolución espectral de 4 cm⁻¹, en un rango de 400-4000 cm⁻¹. Se analizaron todos los espectros con Peak Fit; entonces, se obtuvieron un promedio de los 9 espectros registrados por grupo (n = 36). Finalmente, se realizaron la identificación y asignación de bandas.

Pruebas mecánicas

Se determinó el comportamiento elástico de los andamios mediante la técnica de microindentación, con los datos obtenidos, calculamos el módulo de Young de los

andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, como control, se usaron andamios comerciales de la misma marca y lote; las dimensiones de los andamios fueron de 1 cm³, se usaron andamios por triplicado.

Se usaron andamios húmedos para simular las condiciones en que los andamios pueden someterse en condiciones *in vivo*; se sumergieron en 1 ml de medio de cultivo DMEM-F12 durante 5 minutos antes de comenzar las mediciones de los andamios, y se microindentaron 9 veces a cada muestra en diferentes sitios.

Se examinaron 27 mediciones por grupo; se analizaron los datos obtenidos usando el modelo de Hertz, luego, se estableció el coeficiente de Poisson en 0.5, se calculó el módulo de Young de los andamios, y se usó la siguiente ecuación:

$$E = \frac{3}{4\sqrt{R}} P\delta^{-1.5}$$

Se expresaron los resultados como las medias + - desviación estándar y el valor P.

Capacidad de absorción

Se determinó la capacidad de absorción de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, como control, se usaron andamios comerciales de la misma marca y lote; las dimensiones de los andamios fueron de 1 cm³, se usaron los andamios por triplicado por grupo.

Se determinó la capacidad de absorción por el método gravimétrico estándar; primero, se determinó el peso seco (Wd), luego, se determinó el peso húmedo (Ws), se colocaron en un tubo cónico e inmediatamente se agregó 5 ml de PBS a pH 7.4; finalmente, se incubaron durante 5, 24, 48, 72, 96 y 168 horas a 37 ° C. Se repitió cada experimento de hinchamiento 3 veces.

Se sacaron los andamios húmedos de los tubos cónicos, y se colocaron 10 segundos en papel de absorbente para eliminar el exceso de PBS; a continuación, se pesó cada andamio. Calculamos la capacidad de absorción con la relación del aumento de peso inicial al final, promediamos cada valor por triplicado y utilizamos la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad de absorción (\%)} = \frac{(W_s - W_d)}{W_d} \times 100$$

Se expresaron los resultados como las medias + - desviación estándar y el valor P.

Degradación

Se determinó el tiempo de degradación de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, como control, se usaron andamios comerciales de la misma marca y lote; las dimensiones de los andamios fueron de 1 cm³, se usaron andamios por triplicado por cada grupo. Se determinó el tiempo de degradación por el método gravimétrico estándar. Se usó el método enzimático, con las dos enzimas más abundantes en el modelo *in vivo* colagenasa tipo I y lisozima. Se preparó 100 ml de HEPES, luego se agregó 100 µg de colagenasa tipo I y 0.1% de lisozima; primero, se determinó el peso inicial (Wi), de inmediato, se colocaron los andamios en un tubo cónico, se sumergieron en el amortiguador descrito anteriormente, se mantuvieron durante 24 horas a 37 ° C y se mantuvieron en agitación constantemente en el baño maría, luego se pesaron cada 24 horas para determinar el peso final (Wf).

Se usó el porcentaje de pérdida de peso como indicador de degradación; además, se examinaron 3 mediciones por grupo todos los días durante 21 días, y se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_f} \times 100$$

Se expresaron los resultados como las medias + - desviación estándar y valor P.

hWJ-MCSs

Aislamiento de las hWJ-MSC de los cordones umbilicales

Se aislaron las hWJ-MSC por el método de explante; se colocaron los cordones umbilicales en frascos estériles con suficiente medio de cultivo y se transportaron al laboratorio en refrigeración. Luego, se retiró el medio de transporte y se lavaron con PBS estéril durante tres ocasiones para eliminar las células sanguíneas, inmediatamente, se lavaron con una solución estéril de Hanks; finalmente, se cortaron para extraer la gelatina de Wharton. Se cortó la gelatina de Wharton en fragmentos de 1-2 mm³ con un bisturí estéril. Se mantuvieron los fragmentos en la caja de Petri en cultivo durante 2 semanas en medio de cultivo 1: 1 DMEM-F12, suplementado con penicilina 100 mM, a las 2 semanas, se retiraron los explantes de la placa.

Cuando se estableció el cultivo celular, se hizo el recuento de células viables mediante la prueba de azul de tripano; finalmente, se sembraron las células en botellas de 75 cm², cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 80%, se rompieron los enlaces peptídicos formados por las células en las botellas de cultivo, con una solución de tripsina al 0.5%. Luego, se evaluó su viabilidad y se ajustó la densidad celular; finalmente, se transfirieron a matraces de cultivo de 75 cm² a una densidad de 2×10^6 / cm², y se cultivaron nuevamente para expandir las hWJ-MSC hasta alcanzar una población celular en el pase 3 con una confluencia del 80%.

Inmunofenotipo de las hWJ-MSC

Se usaron hWJ-MSC en el pase 3 a 80% de confluencia; se rompieron los enlaces peptídicos formados por las células en las botellas de cultivo con tripsina al 0.5% y se lavaron con PBS, luego se incubaron las hWJ-MSC con concentraciones saturantes de los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos: CD105, CD90, CD73, CD34, CD45, CD31, HLA-DR y para HLA-ABC, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se eliminó el exceso de anticuerpo mediante 3 lavados con PBS, se analizaron a las hWJ-MSC mediante citometría de flujo, con el equipo FACS Calibur.

Se analizaron los resultados de acuerdo con protocolos estándar, con un analizador FACS Calibur y el software FlowJo. Se identificó la población celular y se determinó si es positiva o negativa para cada marcador establecido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (por sus siglas en inglés, ISCT).

Cultivo de las hWJ-MSCs

Para el trabajo experimental, se usaron hWJ-MSCs previamente aisladas y caracterizadas, que estaban en el pase 3. Se mantuvieron en un medio de cultivo DMEM-F12, y se cambió el medio de cultivo cada 2-3 días. Se mantuvieron las hWJ-MSC en incubación a una temperatura de 37 ° C, con una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO₂.

Ensayos *in vitro*

Adhesión celular

Se determinó la adhesión de las hWJ-MSC cultivándolas en los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M durante 7 días, mediante la presencia o ausencia del motivo RDG en los andamios. Se analizaron los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, donde sembramos hWJ-MSC mediante inmunohistoquímica en ensayos por triplicado con el anticuerpo CD51 / ITGAV, que reconoce el motivo RGD.

Para el cultivo celular, se colocaron los andamios dentro de la campana de flujo laminar, con pinzas estériles, inmediatamente se transfirieron a una placa de 96 pozos, y se sembraron 10,000 hWJ-MSC en los andamios, se mantuvieron durante 7 días en cultivo con medio DMEM -F12. Posteriormente, se lavaron con PBS, luego se fijaron los andamios en solución de para formaldehído al 4% durante toda la noche, luego, se embebieron en parafina y se obtuvieron cortes de 10 µm de espesor.

Para el análisis inmunohistoquímico, se desparafinaron y se deshidrataron los cortes histológicos obtenidos de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, y como control, se usaron bloques de hueso bovino sin procesar. Luego, se lavaron con búfer de citratos a pH 3-3.5. A continuación, se llevó a cabo la recuperación antigénica en una olla a presión a 120 ° C durante 3 minutos, inmediatamente, se bloquearon las enzimas endógenas con PBS albúmina y se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario. Después de ese tiempo, se lavó 3 veces con PBS y se colocó el anticuerpo secundario; finalmente, se reveló con 3,3'-diamino-bencidina (DAB) y se contra tiñó con H&E.

Se tomaron fotomicrografías de los cortes histológicos por medio del microscopio óptico con un aumento de 40x por triplicado para cada grupo. Luego, usando Image-Pro, analizamos las fotomicrografías para cuantificar la expresión de CD51 en los andamios 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M y hueso bovino (n = 3).

Citocompatibilidad de los andamios

Se evaluó la citocompatibilidad de los andamios 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, como control, se usaron los andamios comerciales de la misma marca y lote; las dimensiones de los andamios fueron de 1 cm³, usamos los andamios por triplicado por cada grupo.

Se sembraron 10,000 hWJ-MSC en los andamios; se mantuvieron con las células en cultivo durante 1,3,7,14 y 28 días. Se incubaron a 37 ° C y 5% de CO₂. Se cambió el medio celular cada 2-3 días.

Al final de cada tiempo experimental, se lavaron cada uno de los pozos agregando medio de tal manera que cubriera toda la superficie de los andamios, al completar cada tiempo experimental se agregó el kit vida / muerte, luego se incubaron a 37 ° C con una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO₂ durante 30 minutos. Además, en dos cubreobjetos se sembraron 10,000 hWJ-MSC, en ambos, se realizó un ensayo vida / muerte, en uno de ellos agregamos etanol al 70% como control positivo de muerte; se agregó DAPI para visualizar los núcleos celulares, esto para identificar las características de hWJ-MSC tanto viables como muertas en andamios. Antes de la evaluación microscópica, se retiraron los andamios del matraz de cultivo; luego se colocaron en el portaobjetos con una gota de PBS, finalmente, se observaron por microscopía confocal.

Se obtuvieron fotomicrografías por triplicado para cada grupo de andamios, en cada uno de los diferentes tiempos con el microscopio confocal. Se determinó si las hWJ-MSC estaban vivas o muertas tanto en los diferentes grupos de andamios como en los diferentes tiempos de evaluación, se eligieron imágenes representativas de cada condición de las

imágenes digitales y se contaron las células por medio del software ImageJ. Se expresaron los resultados como las medias + - desviación estándar y valor P.

Mineralización *in vitro*

Se determinó el grado de mineralización de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M después de permanecer en cultivo con hWJ-MSC, durante 14 y 28 días; dentro de la campana de flujo laminar se transfirieron los andamios de los frascos cerrados herméticamente a una placa de 96 pocillos se usaron pinzas estériles, luego, sembramos 10,000 hWJ-MSC en los andamios e inmediatamente, se mantuvieron durante 14 y 28 días en cultivo con medio DMEM-F12; posteriormente, se lavaron con PBS. Finalmente, se fijaron con formaldehído para obtener cortes histológicos de 10 μm , y se tiñeron con von Kossa.

Para los análisis histológicos, se tomaron imágenes de los cortes histológicos teñidos y mediante un microscopio óptico con un aumento de 40x, se obtuvieron fotomicrografías por triplicado para cada grupo. Se analizaron las imágenes obtenidas; se determinó el grado de mineralización del andamio mediante cambios de color asociados con los depósitos de fosfato de calcio por medio del software ImageJ. Se expresaron los resultados como las medias + - desviación estándar y valor P.

Análisis estadístico

Se identificaron las variables, como variables dependientes, el diámetro de mayor de poro, el módulo de Young, el índice de hinchamiento, el tiempo de degradación, el número de células vivas, el área con depósito de calcio y la concentración de HCl a la que obtuvimos los andamios, y como variable independiente el intervalo de tiempo de evaluación experimental; se analizaron los 3 grupos de andamios, que son 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M por triplicado en cada experimento, excepto en el diámetro mayor de poro examinamos 50 mediciones por cada grupo de andamios, espectroscopia Raman y FT-IR se examinaron 9 andamios por cada grupo de andamios, y pruebas mecánicas se examinaron 27 mediciones por cada grupo de andamios, para el análisis estadístico se usaron los valores absolutos obtenidos, y se presentaron los datos experimentales como la media \pm desviación estándar, luego por Prism7, se analizaron por ANOVA de 2 vías; para identificar las diferencias entre un grupo de control (hueso bovino sin procesar o andamio comercial) y 3 grupos experimentales (andamio 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M); finalmente, se realizó la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples, la significación estadística se consideró con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Obtención de los andamios

Después del procesamiento, en el laboratorio se logró estandarizar las técnicas de descelerización, desmineralización del hueso bovino e hidrólisis de la colágena de la matriz extracelular ósea bovina. Así, se obtuvieron 3 diferentes andamios con 3 distintas concentraciones de HCl, andamio 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M. Cabe mencionar que las dimensiones y forma de los andamios se pueden modificar de acuerdo con los requerimientos del estudio tanto *in vitro*, como *in vivo*.

Análisis histológico

Comprobación de la descelularización de los andamios

Los resultados demostraron que los métodos de descelularización utilizados para la obtención de los andamios fueron efectivos. En la Figura 6, se puede observar el análisis microscópico de los andamios teñidos con DAPI en donde los andamios no presentaban núcleos celulares ni material nuclear; sin embargo, en el hueso bovino y los andamios comerciales Biograft® hay núcleos celulares o material nuclear y marcas azules intensas que pueden atribuirse a la detección de dsDNA.

Comprobación de la desmineralización de los andamios

La tinción tricrómica de Masson es indicadora que los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M están compuestos principalmente de colágena, pero en el andamio 0.125 M, hay algunas zonas que indican mineralización y como esperábamos el hueso bovino sin procesar está totalmente mineralizado. Además, se observaron cambios en la estructura de las trabéculas ya que las fibras de colágena estaban más separadas en los andamios 0.25 M y 0.5 M que en el andamio 0.125 M. En los cortes histológicos del andamio 0.125 M, la parte exterior de las trabéculas estuvieron formadas por fibras de colágena compactas (azul) pero con algunas áreas mineralizadas en la parte central de las trabéculas (rojo). El andamio 0.25 M presentó pocos puntos mineralizados (rojo) con las fibras de colágena alineadas en forma paralela (azul intenso). El color azul indicó que las fibras de colágena estaban bien conservadas. En contraste, el andamio 0.5 M presentó muy pocos puntos mineralizados (rojo). Las fibras de colágena tenían una disposición paralela, sin embargo, estaban muy separadas (azul claro). La diferencia de color se relacionó con un mayor grado de desnaturalización de la colágena. Como se esperaba, el hueso bovino sin procesar (rojo intenso) presentó una coloración rojiza debido a su mayor grado de mineralización respecto a la de los andamios procesados (Figura 7). Más adelante relacionaremos estos resultados con los obtenidos mediante EDS.

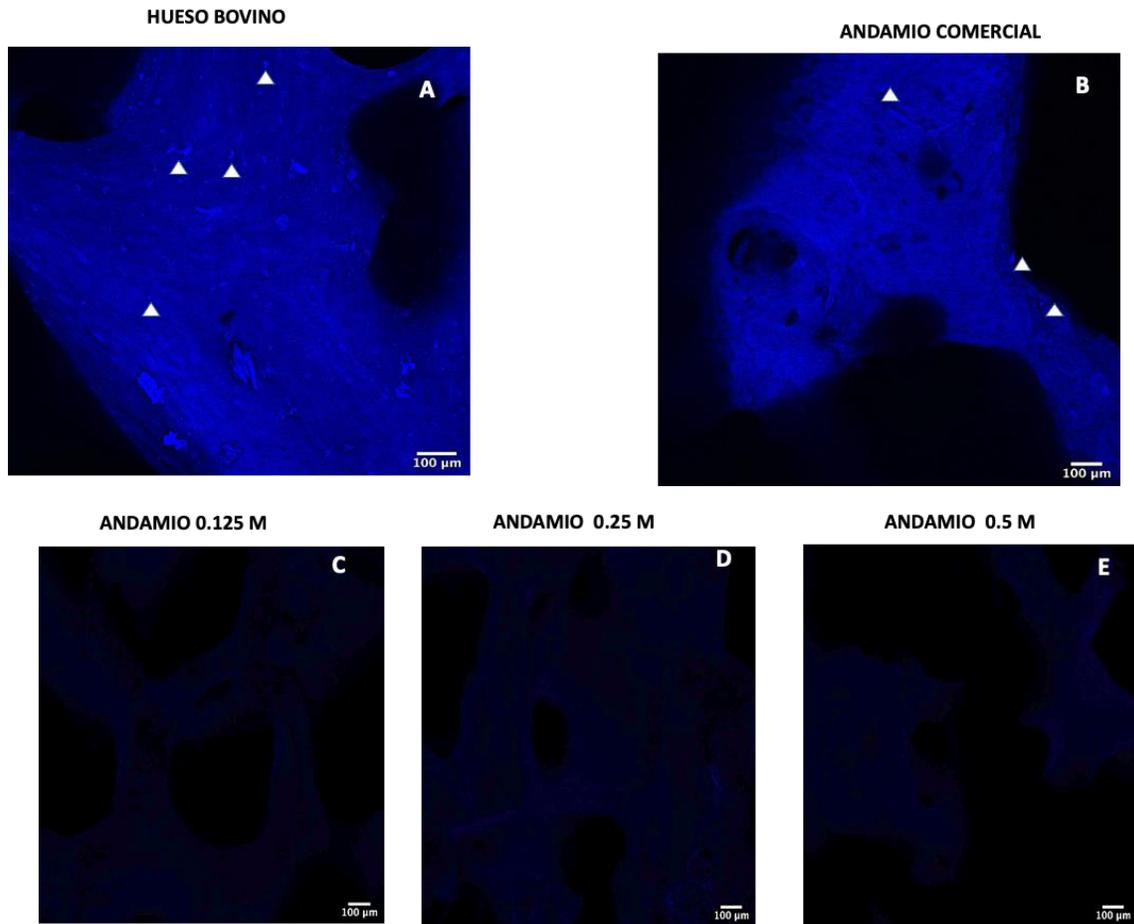


FIGURA 6

Fotomicrografías de andamios de MEC ósea orgánica teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Confirmación del proceso de descelularización. La presencia de núcleos se analizó con tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Fotomicrografías de microscopio confocal de cortes histológicos teñidos con DAPI. Se pueden ver puntos brillantes (puntas de flecha blancas) que indican los núcleos antes de la descelularización (A) y en andamios comerciales (B). Los núcleos están totalmente ausentes después de la descelularización en andamios de 0,125 M (C), 0,25 M (D) y 0,5 M (E). Microscopía confocal. Aumento 40x barra de escala = 100 µm.

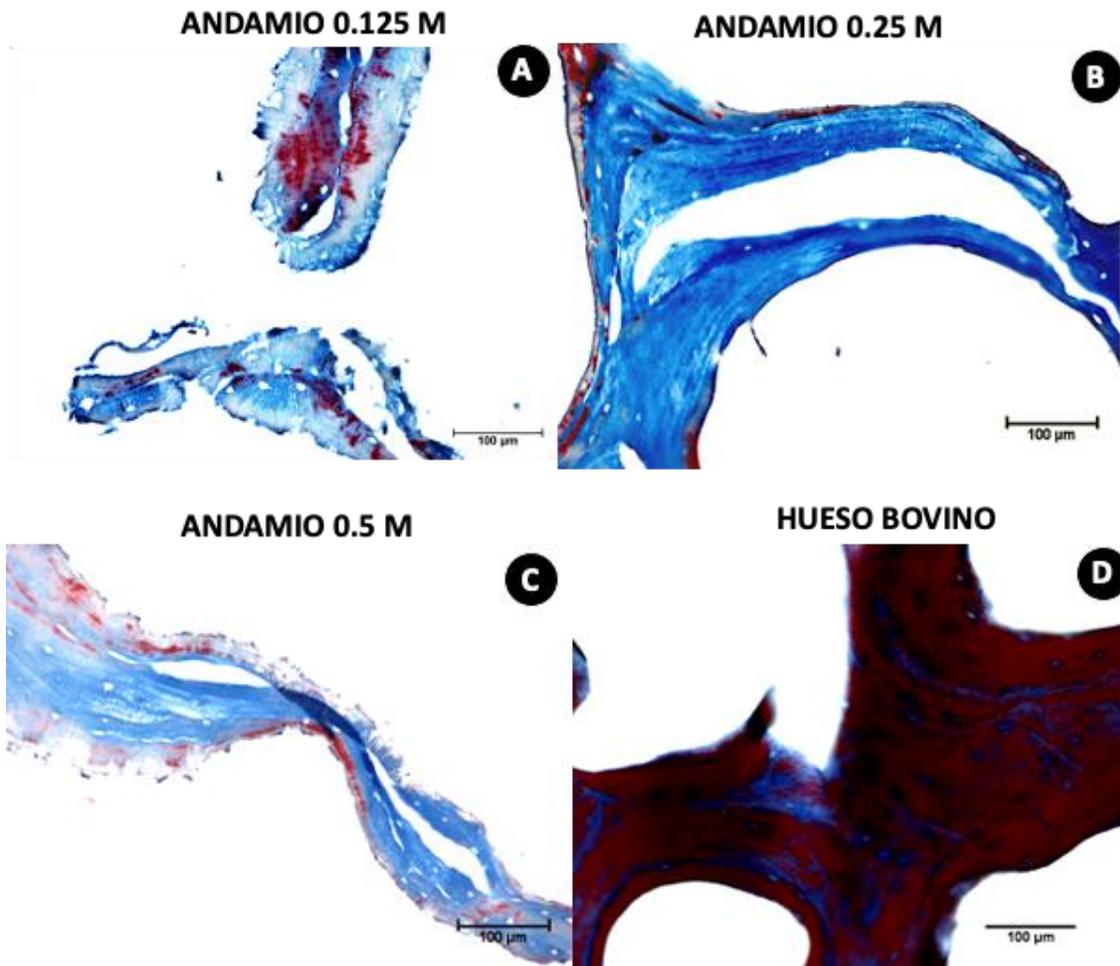


FIGURA 7

Fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con tricrómica de Masson fibras de colágena (azul) y matriz mineralizada (rojo). Análisis histológico de los andamios y hueso bovino. Los andamios de 0,125 M (A), 0,25 M (B) y 0,5 M (C) estaban compuestos de colágena (azul). Sin embargo, en el andamio de 0.125 M, algunas zonas indican la presencia de mineralización (rojo). Como esperábamos, el hueso bovino sin el proceso de desmineralización (D) está compuesto por colágena (azul) y una matriz mineralizada (rojo). Microscopía fotónica de campo claro. Aumento 40x barra de escala = 100 µm.

Caracterización de los andamios

Determinación de la estructura tridimensional de los andamios

Mediante MEB obtuvimos fotomicrografías de cortes transversales de los andamios 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M y hueso bovino. Se demostró que los andamios retienen la estructura tridimensional, los macro poros interconectados después de realizar los métodos de obtención, como se puede observar en la Figura 8, pero las trabéculas son más anchas en los andamios 0.125 M, 0.25 M que en los 0.5 M. De igual manera, en las fotomicrografías medimos el diámetro mayor de poro que se reporta a continuación.

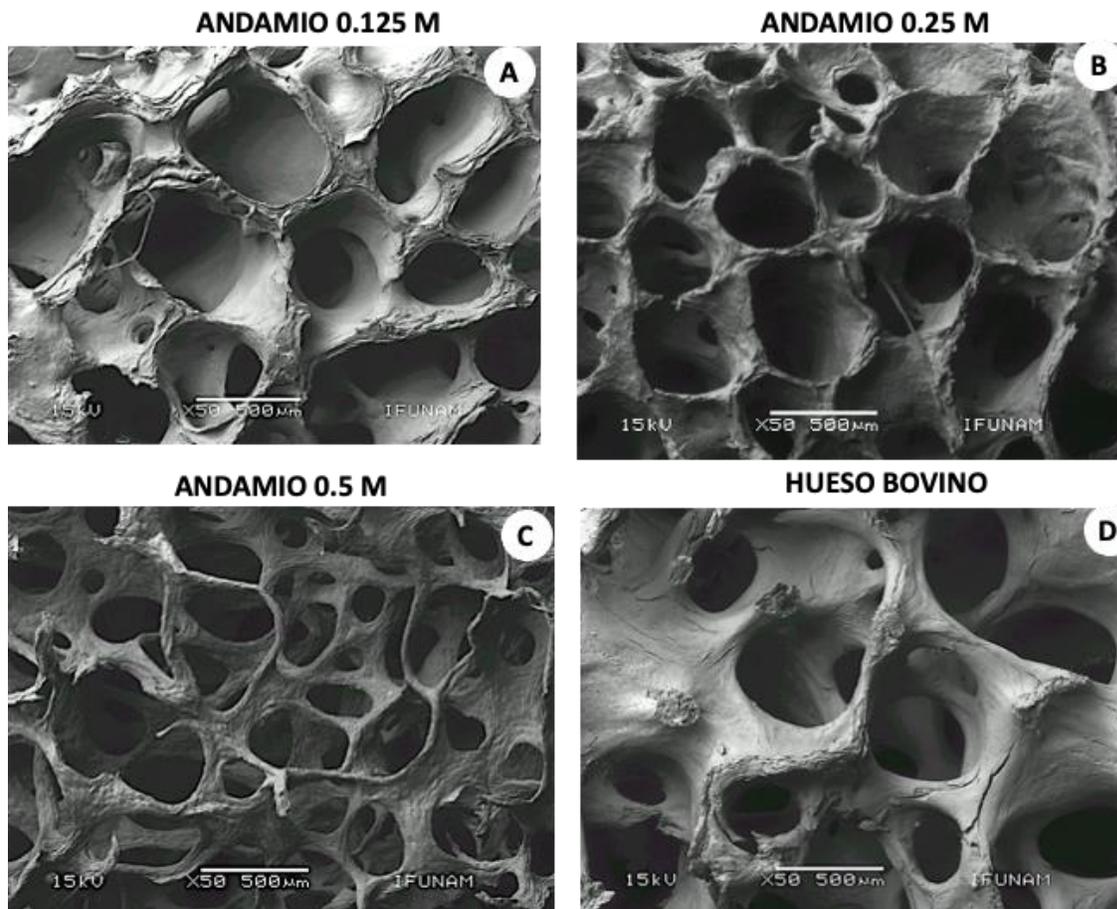
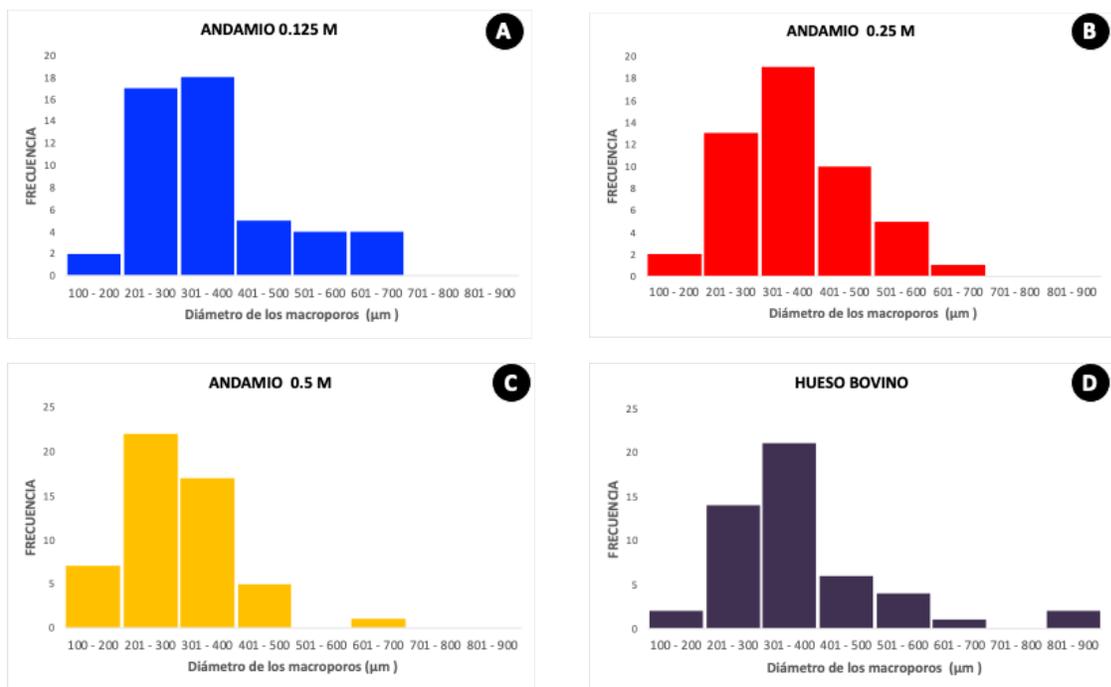


FIGURA 8

Fotomicrografías de los andamios y el hueso bovino. Los andamios 0.125 M (A), 0.25 M (B), and 0.5 M (C) retienen la estructura tridimensional, macro poros interconectados después de realizar los métodos de obtención de los andamios, sin embargo, la estructura, ancho de las trabéculas y el diámetro mayor de poro es menor que en el hueso bovino(D) cuando se incrementa la concentración de ácido clorhídrico (HCl). Microscopía electrónica de barrido (SEM). Técnica de electrones retro dispersados, aceleración de 15 kV. Aumento 50x barra de escala = 500 μm .

Porosidad

En la Gráfica 1 se puede observar la distribución de poros en los andamios 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M y en el hueso bovino, los poros son heterogéneos en su tamaño, ya que varían desde 121 a 944 μm , en donde la media de los poros es mayor a 300 μm . En el andamio 0.125 M $356.69 \mu\text{m} \pm 125.36$, en el 0.25 M $352.82 \mu\text{m} \pm 96.65$ y finalmente en el 0.5 M $300.08 \mu\text{m} \pm 94.96$. Lo anterior mostró que hubo cambios en el diámetro mayor de poro en los distintos andamios que se relacionan de manera directa con el aumento de la concentración de ácido clorhídrico en los andamios 0.5 M, pero no en los andamios 0.125 M ni en el 0.25 M. Más adelante se discutirán los resultados obtenidos para la aplicación planteada.



GRÁFICA 1

Histograma de la distribución del tamaño de poro determinada por el software image J (A-D). El diámetro del macroporo se indica como el diámetro equivalente de los macroporos más grandes observado en AD, los andamios de 0,125 M fueron $356,69 \mu\text{m} \pm 125,36$ (A), los andamios de 0,25 M fueron $352,82 \mu\text{m} \pm 96,65$ (B), los andamios de 0,5 M fueron $300,08 \mu\text{m} \pm 94,96$ (C), y los huesos bovinos sin procesar como control fueron $372 \mu\text{m} \pm 141,6$ (D).

Determinación de la composición inorgánica de los andamios

El microanálisis de dispersión de energía proporcionó información semicuantitativa sobre la composición inorgánica de los andamios obtenidos a las distintas concentraciones de HCl, en donde la ausencia de los elementos calcio y fósforo fueron indicadores de la desmineralización de los andamios. Se determinó el grado de desmineralización de los andamios empleando como indicadores el calcio y fósforo que son los principales componentes de la fase inorgánica del hueso. En general en el hueso bovino los elementos presentes fueron carbono (C), oxígeno (O), sodio (Na), magnesio (Mg), silicio (S), calcio (Ca), cloro (Cl) y fósforo (P). Como era de esperarse hubo picos bien definidos de calcio y fósforo, que fueron indicativos de mineralización ya que se obtuvieron en todas las muestras y sus repeticiones. En contraste, la desmineralización de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M no mostraron picos bien definidos de calcio y fósforo, que como se mencionó anteriormente son los elementos principales que componen a la hidroxiapatita ósea. Este hallazgo confirmó la evidencia obtenida en los cortes histológicos de los andamios 0.25 M y 0.5 M teñidos con tricrómica de Masson en donde se observó que el componente principal de los andamios fue MEC desmineralizada. Cabe mencionar que para materiales 3D, el límite de detección fue de 0.1% en peso, por lo tanto, EDS no puede detectar elementos traza que están a concentraciones por debajo de 0.01% en peso.

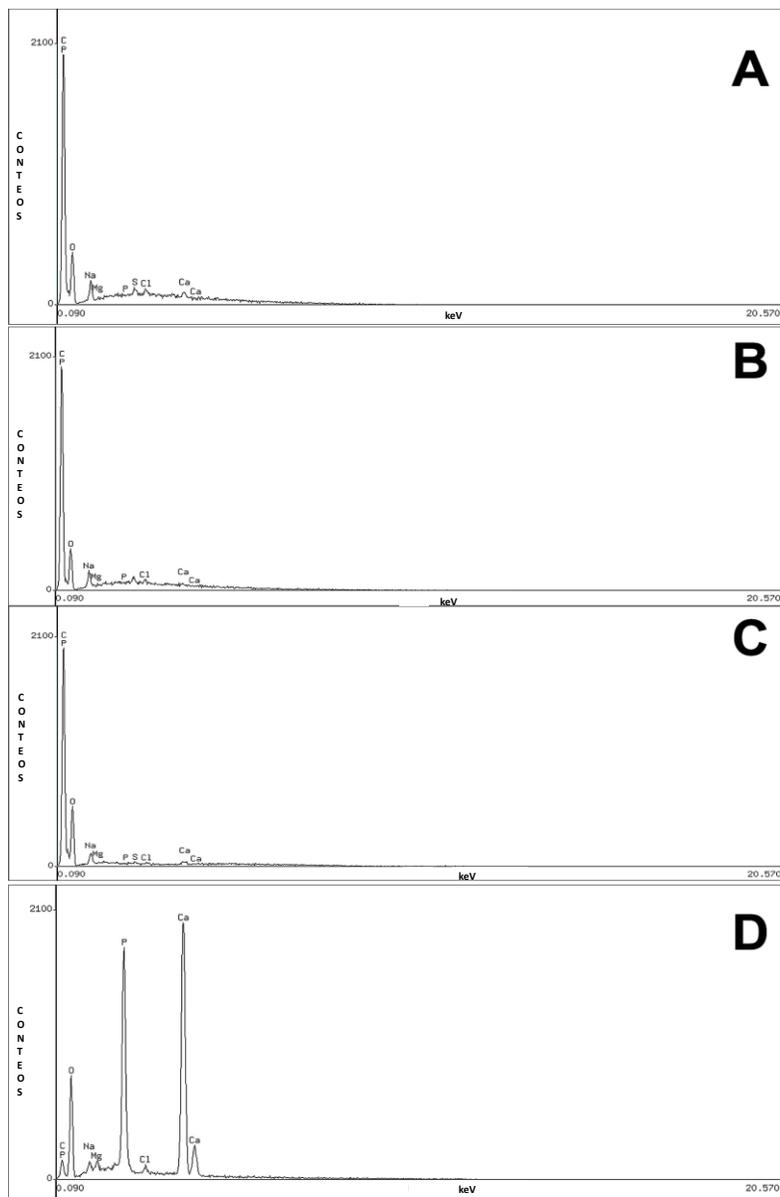


FIGURA 9

El análisis químico por EDS indicó que los andamios no contenían calcio ni fósforo y, por lo tanto, estaban desmineralizados. En contraste, el hueso bovino mineralizado tenía un alto contenido de calcio y fósforo. Los andamios de 0,125 M (A), 0,25 M (B), 0,5 M (C) y (D) hueso bovino.

Determinación de la composición química de los andamios

En la colágena tipo I hay once bandas en el espectro Raman 1670, 1476, 1299, 1243, 1082, 1060, 1032, 1002, 930, 854 y 13 cm^{-1} (Kochetkova *et al.* 2021). En la Figura 10, los espectros Raman, que se obtuvieron de los andamios de 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, presentaron una huella dactilar típica de la colágena tipo I (Figura 11), lo que indicó que

el componente principal de los andamios es el colágena tipo I. En todos los espectros Raman hay bandas evidentes a 1669 cm^{-1} Amida I ν ($\text{C}=\text{O}$), 1456 cm^{-1} δ (CH_2 , CH_3), 1279 cm^{-1} Amida III δ (NH_2), 1256 cm^{-1} Amida III (CN), 1101 cm^{-1} ($\delta\text{NCH Pro}$), 1000 cm^{-1} fenilalanina, esqueleto de la proteína de 932 cm^{-1} ν (CC), anillo de prolina 859 cm^{-1} ν (CC) y 828 cm^{-1} ν (CC) esqueleto de la proteína. También se observaron bandas estrechas en la posición 1669 cm^{-1} , 1456 , 1279 cm^{-1} , 1256 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} , y bandas menos definidas en la posición 1101 cm^{-1} – 1932 cm^{-1} , 859 cm^{-1} , y 828 cm^{-1} , estos resultados se discutirán más adelante.

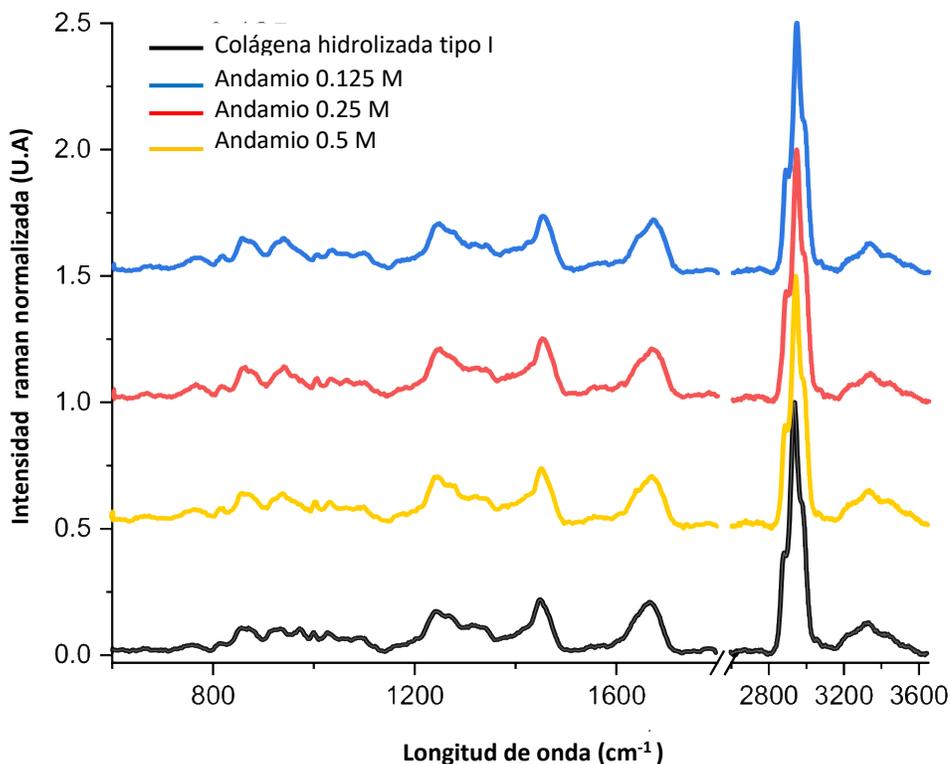


FIGURA 10

Espectros raman de andamios obtenidos a diferentes concentraciones de HCl: azul (0,125 M), rojo (0,25 M) y amarillo (0,5 M), así como en negro la colágena hidrolizada tipo I como referencia. Espectros Raman representativos, $n > 3$.

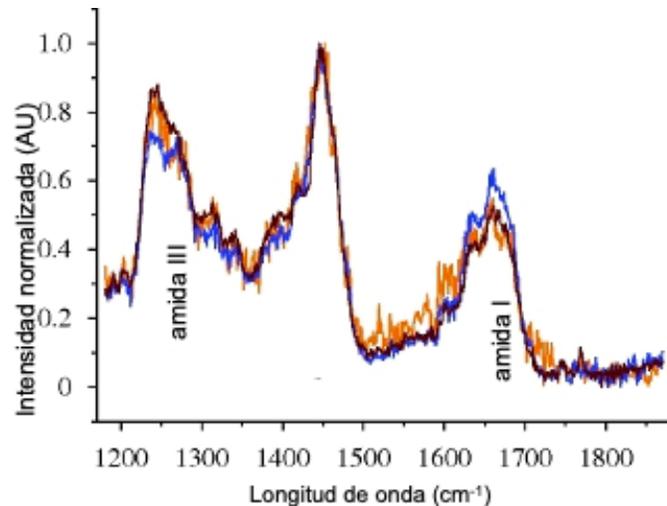


FIGURA 11

Espectro obtenido mediante espectroscopía Raman, donde se observan las bandas características de la colágena tipo I. Traducido de Janko, M., Zink, A., Gigler, A. M., Heckl, W. M., & Stark, R. W. (2010). Nanostructure and mechanics of mummified type I collagen from the 5300-year-old Tyrolean Iceman. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1692), 2301-2309.

Determinación de la presencia de colágena tipo I en los andamios

Todos los espectros de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, presentan dos regiones principales: 1) la región de grupos funcionales ($\approx 4000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$), donde se identificó cada grupo funcional para sus tipos específicos de enlaces, rangos de frecuencia de espectroscopia de asignación y su intensidad, y 2) la región de huella dactilar ($\approx 1500\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) que es un área única para cada molécula, por lo que permite identificarlas y puede ser característica de la simetría molecular o de una combinación de bandas que surgen de múltiples enlaces deformados simultáneamente (Figura 12). Así, se identificaron las posiciones de enlaces infrarrojos, su tipo de vibración y su representación de grupo funcional presente en los andamios. En la colágena bovina tipo I en polvo en la región de los grupos funcionales hubo las siguientes bandas: 3305 cm^{-1} asociada con el estiramiento NH y bandas de hidrógeno presentes en la colágena (Amida A) y otra a 3081 cm^{-1} asociada con el estiramiento CH (Amida B) (Sanden *et al.* 2021).

La región de la huella dactilar confirma que en la composición de todos los andamios se encuentra la proteína de colágena tipo I, sin embargo, en los andamios hay cambios en las bandas relacionadas con el anillo de piridina, hidroxiprolina y cadenas laterales de prolina (Vidal and Mello, 2011; Vidal, 2014). Las posibles causas y e implicaciones de la presencia y ausencia de estas bandas se discutirá posteriormente, sin embargo, las tres bandas están involucradas en mantener la estructura de la triple hélice de la colágena. La región de la huella dactilar presenta las siguientes bandas: 1654 cm^{-1} asociadas con las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo a lo largo del esqueleto del polipéptido (Amida I), 1549 cm^{-1} con un hombro a 1270 cm^{-1} asociado con las vibraciones de flexión de NH y el estiramiento CN respectivamente (Amida II), 1453 cm^{-1} asociada con el anillo de piridina que estabiliza la triple hélice de la colágena por puentes intracatenarios H^+ , 1239 cm^{-1} asociado con el estiramiento de CH, 1084 cm^{-1} asociado con hidroxiprolina

que une los grupos prolihidroxilo y los grupos carbonilo de la cadena principal, y finalmente 1041 cm^{-1} asociados con cadenas laterales de prolina que permiten la torsión de la triple hélice de colágena (Rose *et al.* 2006) (Figura 13). Hay una diferencia muy notable entre los andamios analizados, mientras que en los andamios 0.25 M, las bandas 1030 , $1,059$ y $1,083\text{ cm}^{-1}$ están bien definidas no lo están en los andamios 0.125 M ni 0.5 M; las posibles causas y e implicaciones en los resultados se discutirá posteriormente.

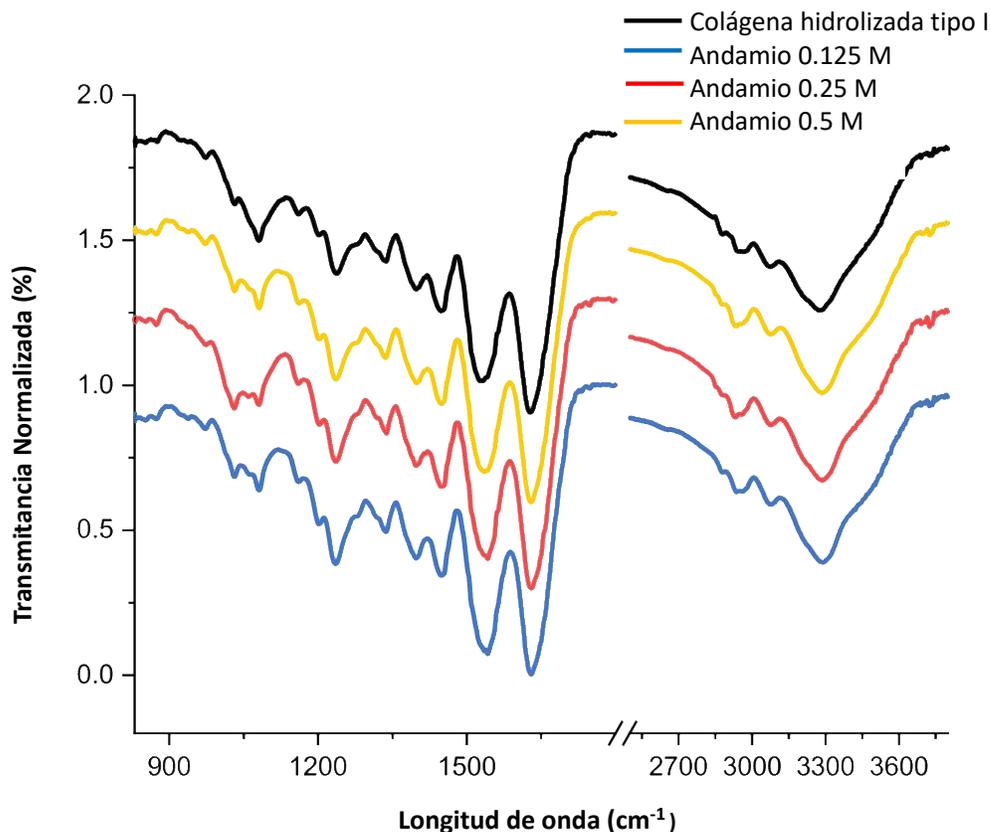


FIGURA 12

Espectros FT-IR de muestras preparadas con diferentes concentraciones de HCl: azul (0,125 M), rojo (0,25 M) y amarillo (0,5 M), así como en negro la colágena hidrolizada tipo I. Espectros FT-IR representativos $n > 3$.

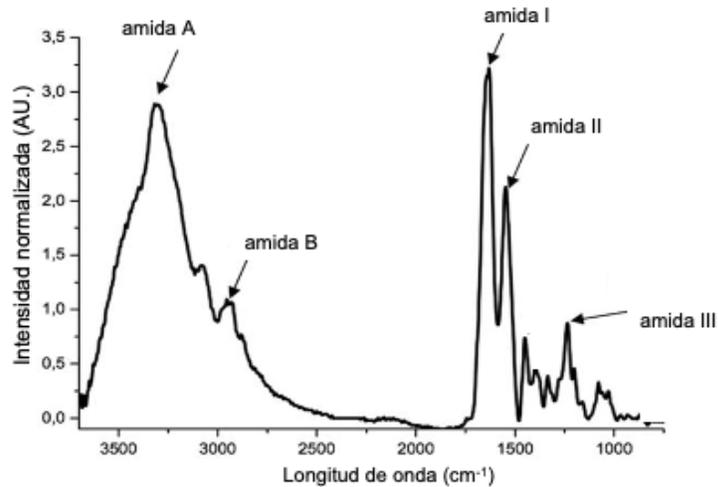


FIGURA 13

Espectro obtenido mediante FT-IR donde se observan las bandas características de la colágena tipo I. Traducido de Júnior, Zenildo Santos Silva, et al. Effect of papain-based gel on type I collagen-spectroscopy applied for microstructural analysis. Scientific reports, 2015, vol. 5, p. 11448.

Módulo de Young de los andamios

La prueba de microindentación se ha aplicado ampliamente para medir las propiedades mecánicas de los sólidos. El microindentador registra la carga y el desplazamiento del indentador y obtiene una curva carga- desplazamiento de indentación. Esta prueba se basa en la teoría de Hertz según el contacto entre una esfera rígida (la punta del indentador) y una superficie plana (el andamio). Así, se usó esta técnica para determinar los posibles cambios en la matriz extracelular ósea mineralizada (andamios comerciales) y desmineralizada (andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M).

La técnica de microindentación, como ya se mencionó, representa mediciones de fuerza-posición-tiempo, por lo tanto, permite calcular el módulo de Young. Los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones de medición en todos los andamios para calcular el módulo de Young proporcionan evidencia suficiente de que el módulo de Young de los andamios 0.5 M ($P = 0.7$), 0.25 M ($P = 0.5$), son similares a los andamios comerciales (Tabla 3), con excepción de los andamios 0.125 M ($P = 0.003$) ya que es mayor que el de los andamios comerciales. Por lo tanto, las propiedades mecánicas de los andamios de 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M son heterogéneas entre los 3 grupos diferentes y entre las diferentes regiones evaluadas. Más adelante discutiremos las posibles causas de estos resultados y la importancia del módulo de Young en las respuestas celulares evaluadas en este estudio.

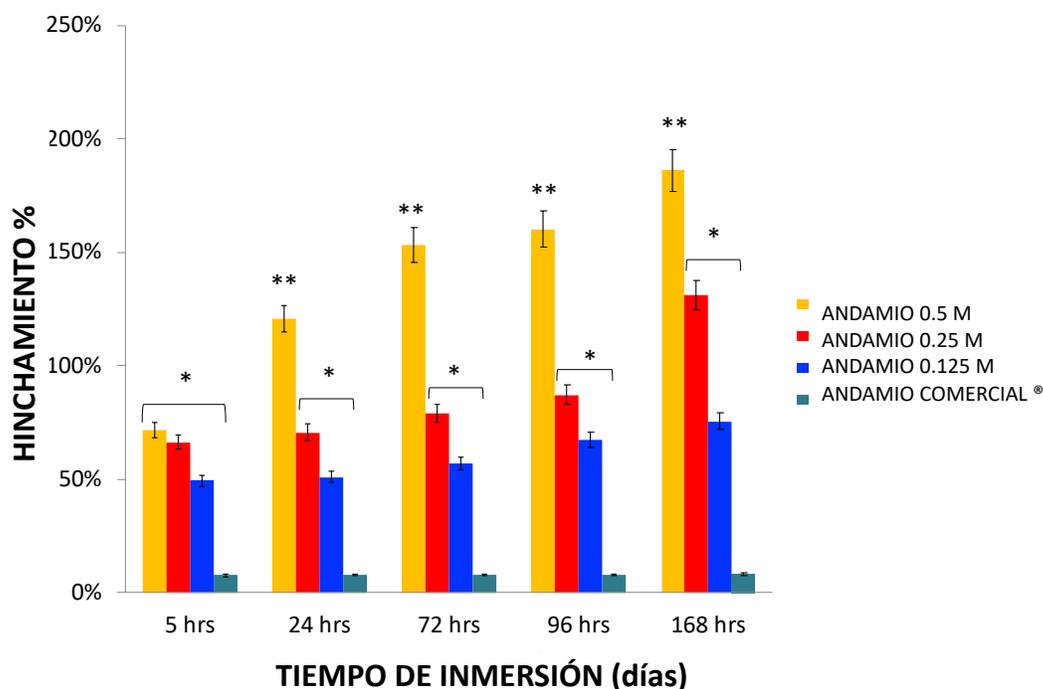
	ANDAMIO 0.125 M	ANDAMIO 0.25 M	ANDAMIO 0.5 M	ANDAMIO COMERCIAL
MODULO DE YOUNG (KPa)	1122.65 ± 1352.69	385 ± 476	231.2 ± 237.8	282.6 ± 470.5

TABLA 3

Módulo de Young obtenido en andamios húmedos 0,125 M, 0,25 M y 0,5 M.

Capacidad de absorción de los andamios

La capacidad de absorción fue relativamente rápida en todos los grupos después de la inmersión en PBS Gráfica 2. En el caso de los andamios de 0.5 M, la capacidad de absorción fue de aproximadamente del 72% después de 5 horas de inmersión en PBS a 37 °C. El mayor porcentaje de absorción se obtuvo del grupo de andamios obtenido a la concentración más alta de HCl (P = 0.007). En contraste, se obtuvo el porcentaje más bajo en los andamios comerciales, a las 168 horas. Los andamios de 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M aumentaron el porcentaje de absorción de 5 horas a 168 horas (P = 0.05, P = 0.0019 y P = 0.0004, respectivamente).

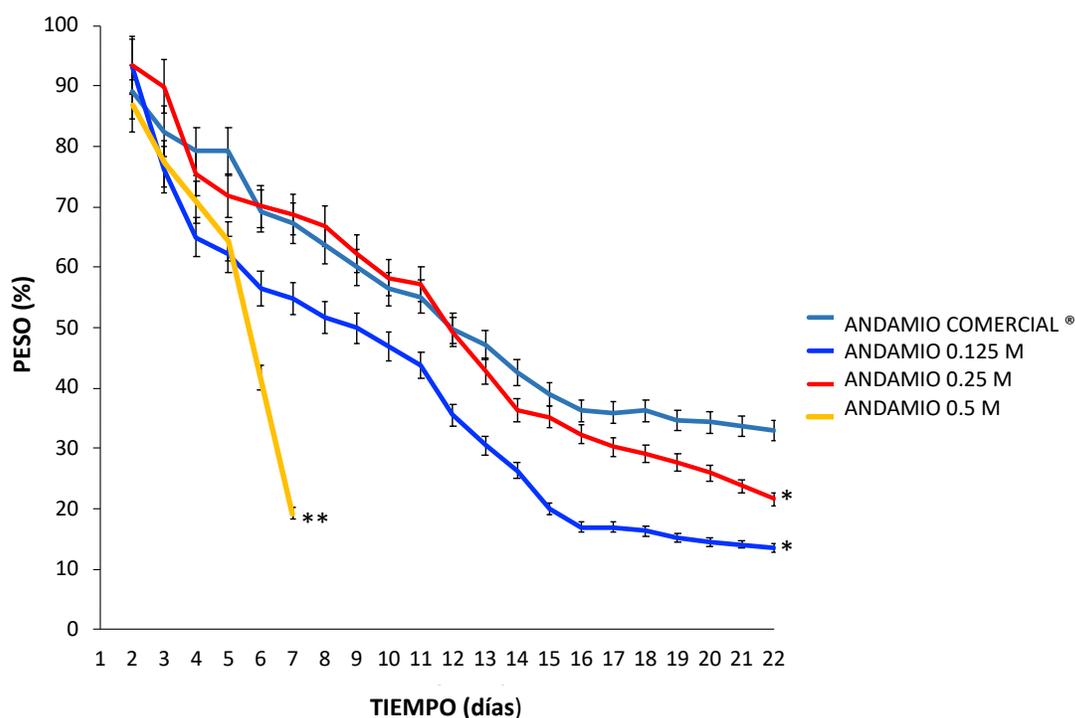


GRÁFICA 2

El hinchamiento de los andamios se determinó gravimétricamente incubando los andamios con PBS a 37 °C (pH 7,4) a diferentes intervalos de tiempo. El hinchamiento de los andamios de 0,125 M y 0,25 M fue mayor que el de los andamios comerciales a las 5, 24, 72, 96 y 168 horas * p < 0,05, mientras que el hinchamiento de los andamios de 0,5 M fue mayor que el de los 0,125 M, 0,25 M y andamios comerciales a las 24, 72, 96 y 168 horas ** p < 0,0001. Media ± DE n > 3.

Degradación de los andamios

Los andamios 0.125 M y 0.25 M perdieron más del 70% de su peso en 21 días. Sin embargo, los andamios 0.5 M perdieron más del 80% de su peso en 7 días en las mismas condiciones (Gráfica 3). Como se esperaba, los andamios 0.5 M, que se procesaron a la concentración más alta de HCl perdieron mayor porcentaje de peso en menos tiempo ($P = 0.033$). En contraste, los andamios 0.125 M y 0.25 M tuvieron un porcentaje de pérdida de peso similar a la de los andamios comerciales ($P = 0.99$ y $P = 0.56$ respectivamente). Los datos obtenidos sugieren fuertemente que los andamios 0.125, 0.25 y 0.5 tuvieron diferentes pérdidas de peso que pueden ser relacionados con el grado de degradación que alcanzado la MEC durante el procesamiento para obtener los andamios. Este punto se discutirá posteriormente.



GRÁFICA 3

La tasa de degradación *in vitro* se determinó gravimétricamente tratando los andamios en un búffer de degradación a 37 °C en agitación continua. El andamio 0,5 M, procesado a la mayor concentración de HCl, perdió más peso que los andamios 0,125 M, 0,25 M y comerciales a los 7 días ** $p < 0,0001$. Después de este tiempo, el andamio 0,5 M se disolvió en el búffer de degradación y fue imposible evaluarlo. Los andamios de 0,125 M, 0,25 M, perdieron más peso que los andamios comerciales a los 28 días. * $p < 0,05$. Media \pm DE $n > 3$.

hWJ-MSC

Aislamiento de las hWJ-MSCs de los cordones umbilicales

Obtuvimos hWJ-MSCs mediante método de explante en los cordones umbilicales humanos, las células estaban viables, con morfología característica fibroblástica, capaces de adherirse a las botellas de cultivo y proliferar (Figura 14). Los cultivos de hWJ-MSC

se establecieron con éxito a partir de los 3 cordones umbilicales; en el pase 0, las hWJ-MSC eran adherentes con población homogénea y morfología fibroblástica; mantuvimos las hWJ-MSC en cultivo hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80% y llegaron a pase 3.

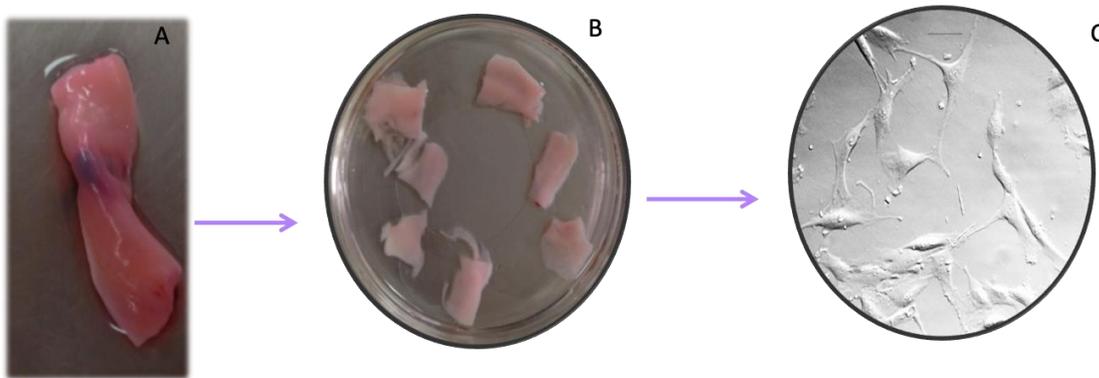


FIGURA 14

Aislamiento y cultivo celular de las hWJ-MSCs. Cordón umbilical humano (A), Explantes gelatina de Wharton para aislar hWJ-MSCs (B), Cultivo celular establecido después de mantener en cultivo las hWJ-MSCs durante 7 días.

Inmunofenotipo de las hWJ-MSCs

Analizamos las hWJ-MSCs en el pase 3 por citometría de flujo para determinar si eran positivas para los marcadores mesenquimales CD 73, CD 90, CD 105, negativas para los marcadores hematopoyéticos CD 34, CD 45, CD 11b, CD 19 y antígenos leucocitarios humanos HLA-DR y HLA-ABC (Figura 15) de acuerdo con los criterios mínimos para las MSC establecidos por Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), más adelante discutiremos el inmunofenotipo de las hWJ-MSCs y su relevancia en este proyecto.

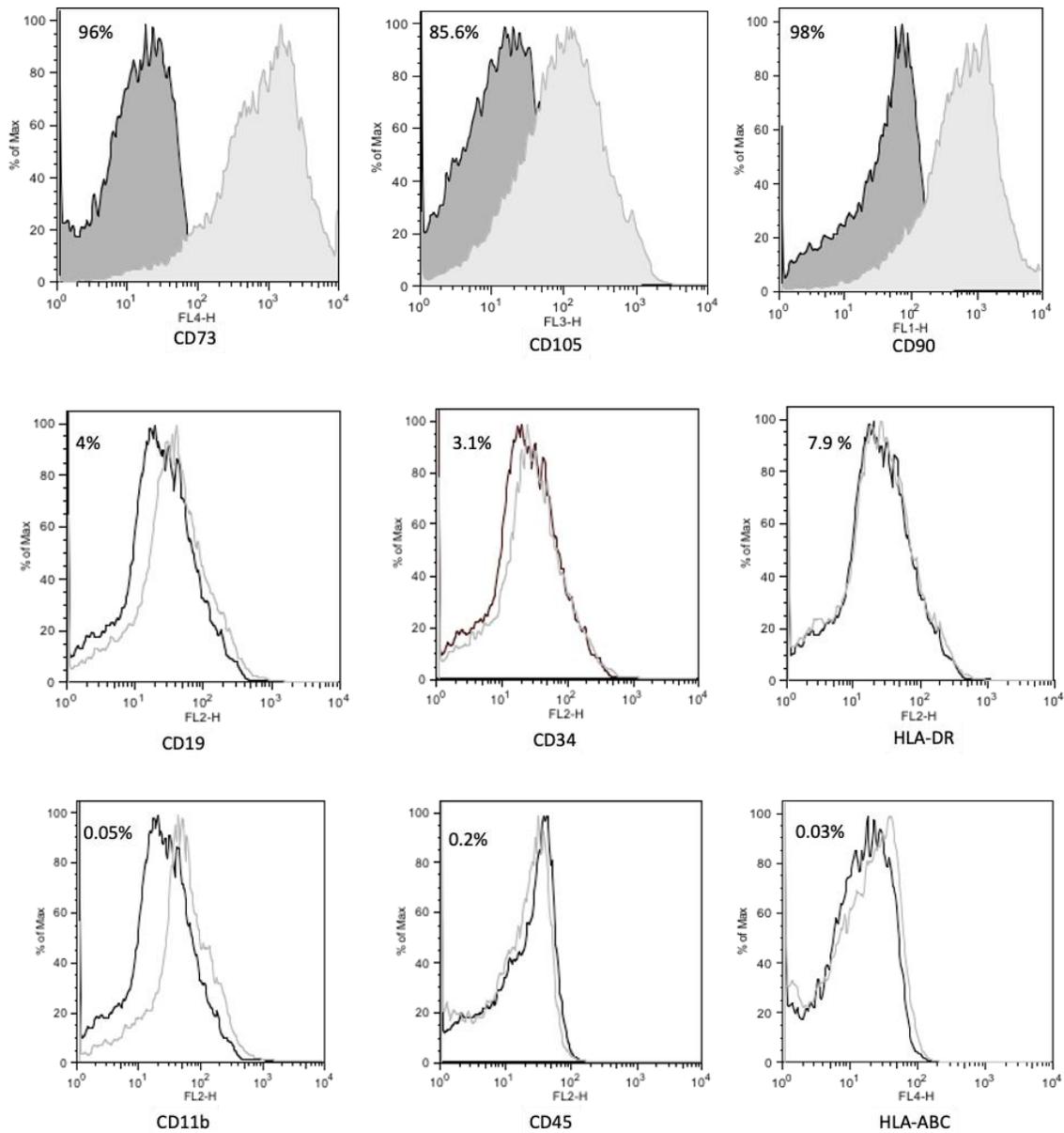


FIGURA 15

Histogramas del inmunofenotipo de las hWJ-MSCs. En análisis mediante citometría de flujo indica que las hWJ-MSCs a pase 3 son positivas a los marcadores característicos de las células mesenquimales que son CD 73, CD 90, CD 105, negativas a los marcadores hematopoyéticos CD 34, CD 45, CD 11b, CD 19 y a los antígenos leucocitarios humanos HLA-DR y HLA-ABC; lo anterior son los lineamientos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) para las células mesenquimales.

Cultivo de las hWJ-MSCs

Las hWJ-MSCs aisladas de los cordones umbilicales humanos por el método de explante, eran visibles en el fondo de la caja de cultivo a partir del día 3 y alcanzaron una confluencia entre el 70-80% entre los 7-10 días de cultivo, las células estaban adheridas

y con su morfología fibroblástica característica, más adelante discutiremos la importancia del método de aislamiento y la confluencia a la que se mantuvieron en cultivo.

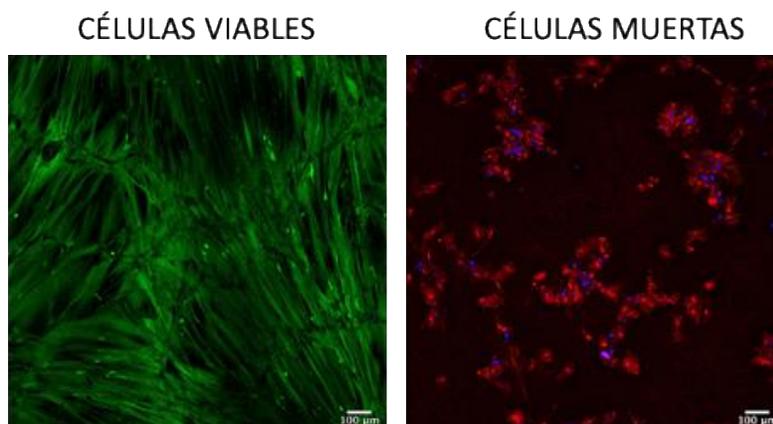


FIGURA 16

Cultivo celular in vitro y viabilidad de hWJ-MSCs. Microfotografías de microscopio confocal de hWJ-MSCs. Sembramos 10 000 hWJ-MSCs en monocapa en portaobjetos de microscopio simples. En ambos, realizamos un ensayo live/dead. Observamos células viables (fluorescencia verde, calceína, AM) (A) y células muertas (fluorescencia roja, homodímero de etidio) núcleos celulares (azul, DAPI) (B). Microscopia confocal. Aumento 40x; barra escala=100 µm.

Determinación de la viabilidad celular

Adhesión celular

Los andamios mostraron inmunotinción positiva para motivos RGD; muchas proteínas de adhesión en la MEC son positivas para CD51 y reconocen motivos RGD, aunque la intensidad y ubicación varía en los diferentes andamios. Además, hubo hWJ-MSC viables y adheridas a los 7 días. (Figura).

Los datos de inmunotinción sugirieron fuertemente que los andamios 0,125 M y 0,25 M se obtuvieron con las concentraciones óptimas para exponer motivos RGD, hay una marca positiva a CD51 distribuida a lo largo de las trabéculas $83,39 \% \pm 4,65$ y $78,73 \% \pm 4,01$, respectivamente, y no hay diferencias significativas entre ambos grupos. En cambio, en los andamios 0,5 M sólo hay marca positiva en los puntos focales centrales de las trabéculas y tuvieron una menor expresión de CD51 $22,69\% \pm 0,92$, pero los andamios 0,125 M y 0,25 M presentan diferencias significativas * $p < 0,0001$ con respecto al hueso bovino.

Es de notar que los bloques de hueso bovino sin procesar, utilizados como control, mostraron trabéculas con una marca ligera y difusa. Posteriormente, se discutirá el uso del motivo RGD como indicador de adhesión celular.

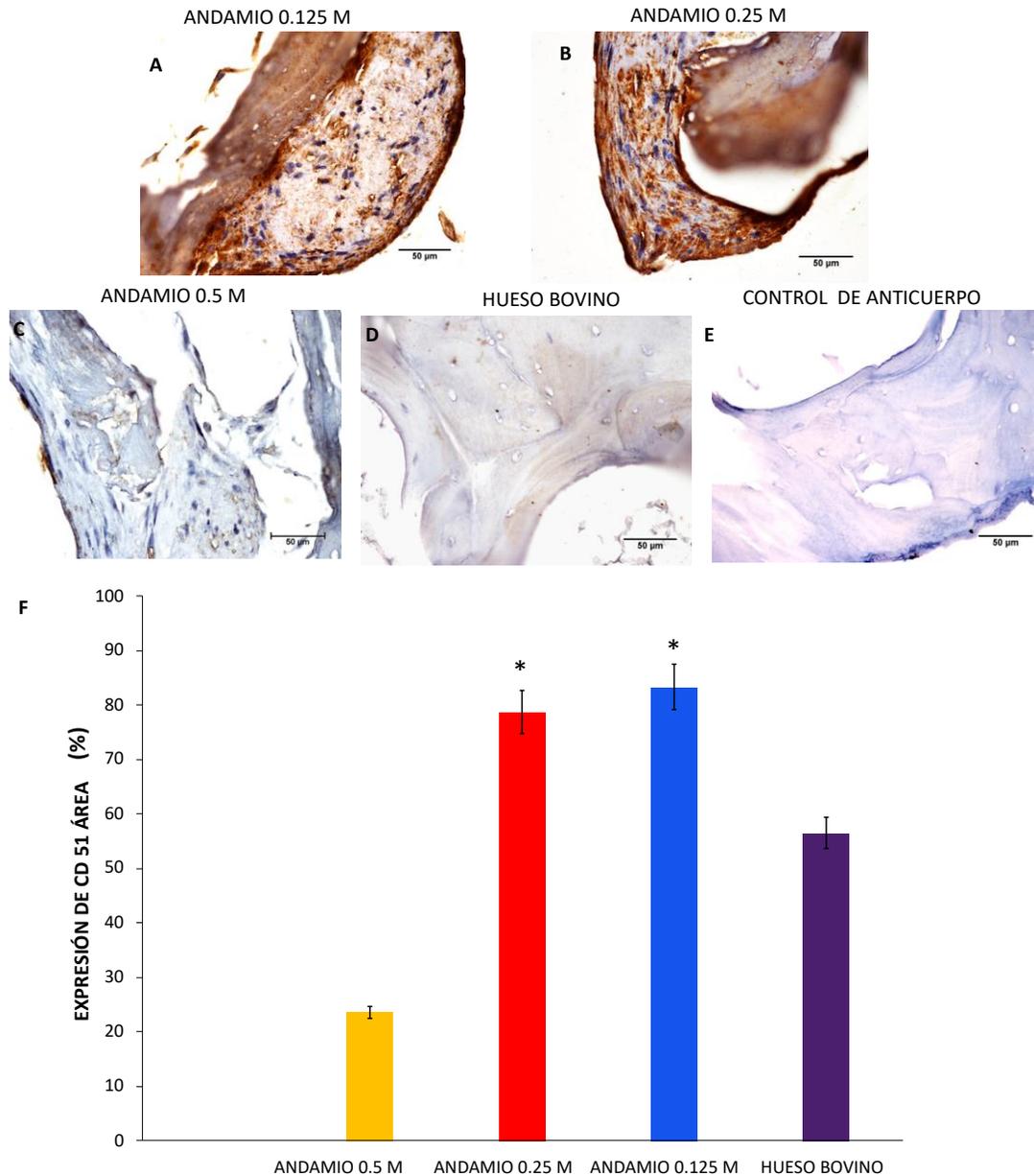


FIGURA 17

Fotomicrografías de cortes histológicos de los andamios sembrados con hWJ-MSCs y cultivados 7 días. Análisis inmunohistoquímico en cortes histológicos de los andamios y hueso bovino inmunomarcado con CD51 (marrón). Los andamios fueron positivos a la tinción de anticuerpos CD51 en 0,125 M (A), 0,25 M (B) y 0,5 M (C). Como controles, usamos hueso bovino sin proceso de descelularización (D) y hueso sin anticuerpo primario (E) Los andamios de 0,125 M y 0,25 M presentan diferencias significativas en comparación con el andamio de hueso bovino y 0,5 M. * $p < 0,0001$, Medis \pm DE $n > 3$ (F). Microscopía óptica Aumento 40x, barra de escala = 50 μ m.

Citocompatibilidad de los andamios

Para evaluar la citocompatibilidad se cultivaron hWJ-MSCs sobre los andamios y después las células fueron teñidas con el kit live/dead. Los compuestos del kit evidencian a las células vivas con una señal fluorescente de color verde (positivas a calceína-AM) y a las células muertas con una fluorescencia de color rojo (positivas a homodímero de etidio).

En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos de los andamios en los que cultivamos hWJ-MSCs durante 1, 3, 5, 7, 14, 28 días y que se observaron mediante microscopía confocal. En los andamios 0.125 M, 0.25 M, 0.5 y comercial, hubo células viables y adheridas en todos los tiempos de evaluación. Más adelante se explican y discuten variación en la cantidad, ubicación, morfología y orientación de las células en los diferentes andamios en los distintos momentos de evaluación.

En el día 1 de cultivo, se observaron células viables y adheridas en todos los andamios; sin embargo, había más células en el andamio comercial. En el día 3 de cultivo, el mayor número de células vivas correspondió a los andamios de 0.25 M a los 3, 7, 14 y 28 días de cultivo $17 \pm 4,05$, $255 \pm 7,02$, $875 \pm 13,4$ y $806 \pm 8,6$ respectivamente ** $p < 0,001$ en comparación con 0.125 M, 0.5 M y andamios comerciales. Mientras que en los andamios 0.125 M y 0.5 M a los 7, 14 y 28 días de cultivo hubo más células viables que en los andamios comerciales en comparación con los andamios comerciales * $p < 0.05$.

No observamos células muertas en los andamios (fluorescencia roja: homodímero de etidio), dado que las hWJ-MSC presentaron anoikis, una forma de muerte en las células dependientes del anclaje, en donde su viabilidad depende de su adhesión a un sustrato.

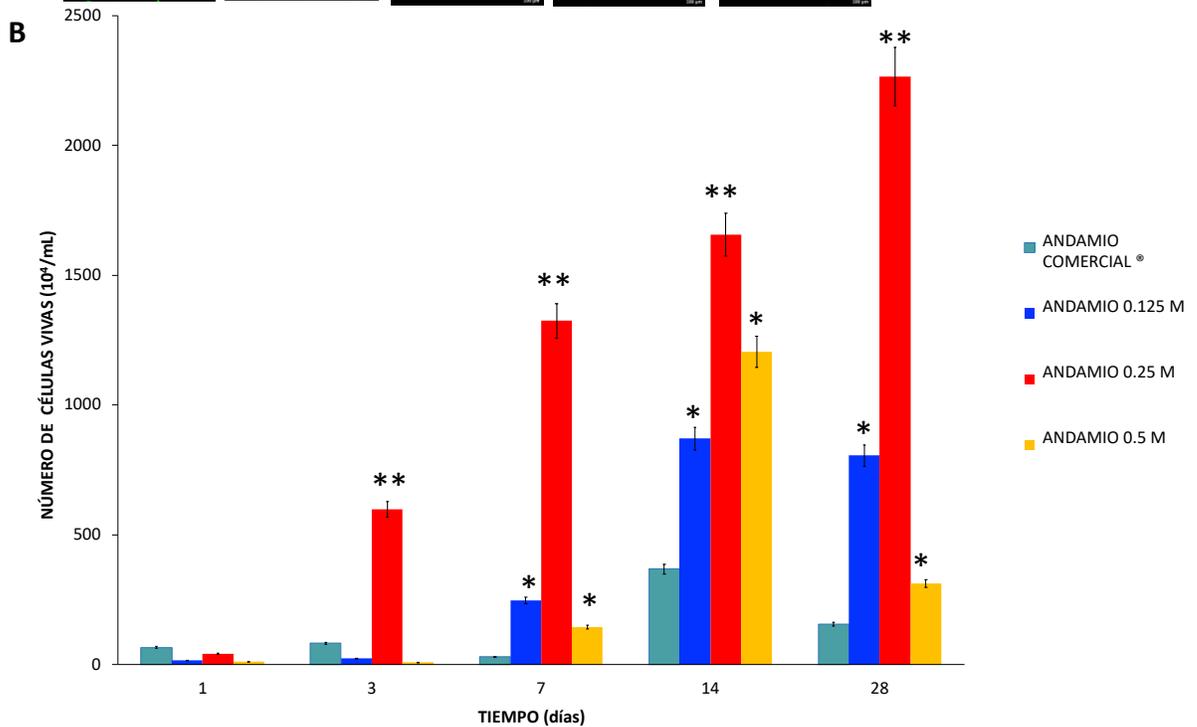
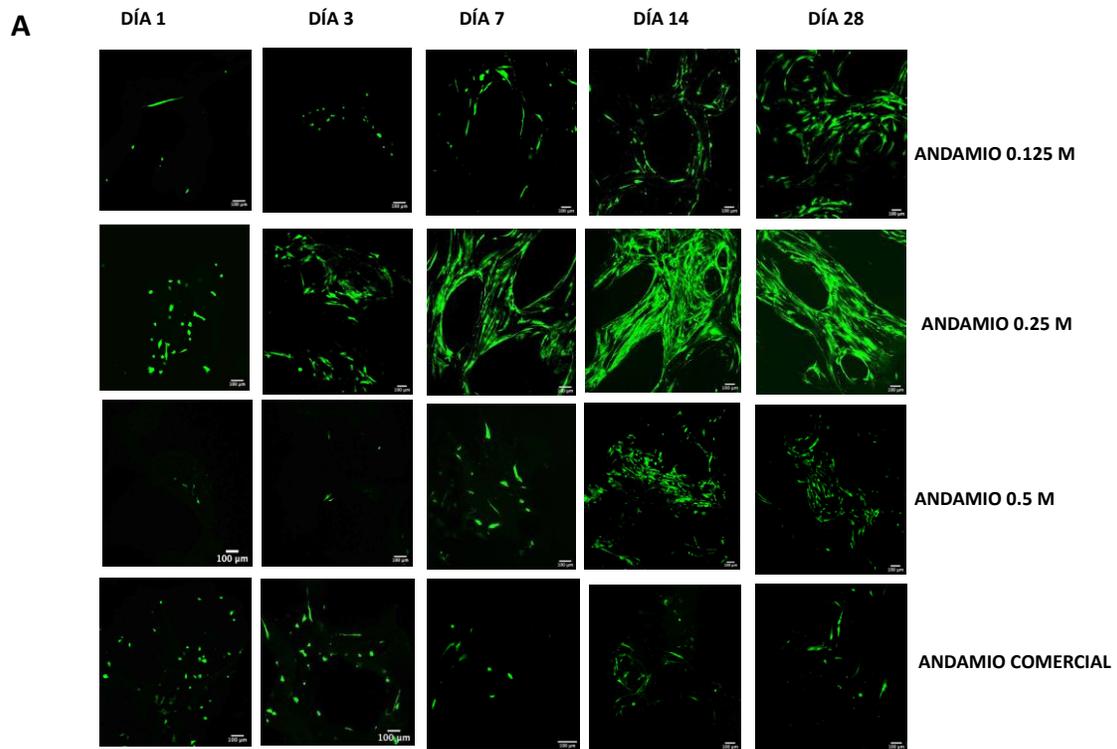


FIGURA 15

Fotomicrografías de hWJ-MSCs sembradas en los andamios. Viabilidad *in vitro* de hWJ-MSC mediante ensayo live/dead. Células viables (fluorescencia verde-Calceína-AM), células muertas (fluorescencia roja-homodímero de etidio) y núcleos celulares (azul-

DAPI). (A) Ensayo vida/muerte de hWJ-MSC cultivadas en los andamios. (B) Evaluación cuantitativa por células de conteo ImageJ de hWJ-MSC cultivadas en los andamios. En los andamios 0,25 M a los 3, 7, 14 y 28 días de cultivo hay más células viables que en los otros grupos ** $p < 0,0001$. Además, en los andamios 0,125 M y 0,5 M a los 7, 14 y 28 días de cultivo hay más células viables que en los andamios comerciales en comparación con los andamios comerciales * $p < 0,05$. Media \pm DE n >3 . Microscopia confocal. Aumento 40x, barra de escala = 100 μm .

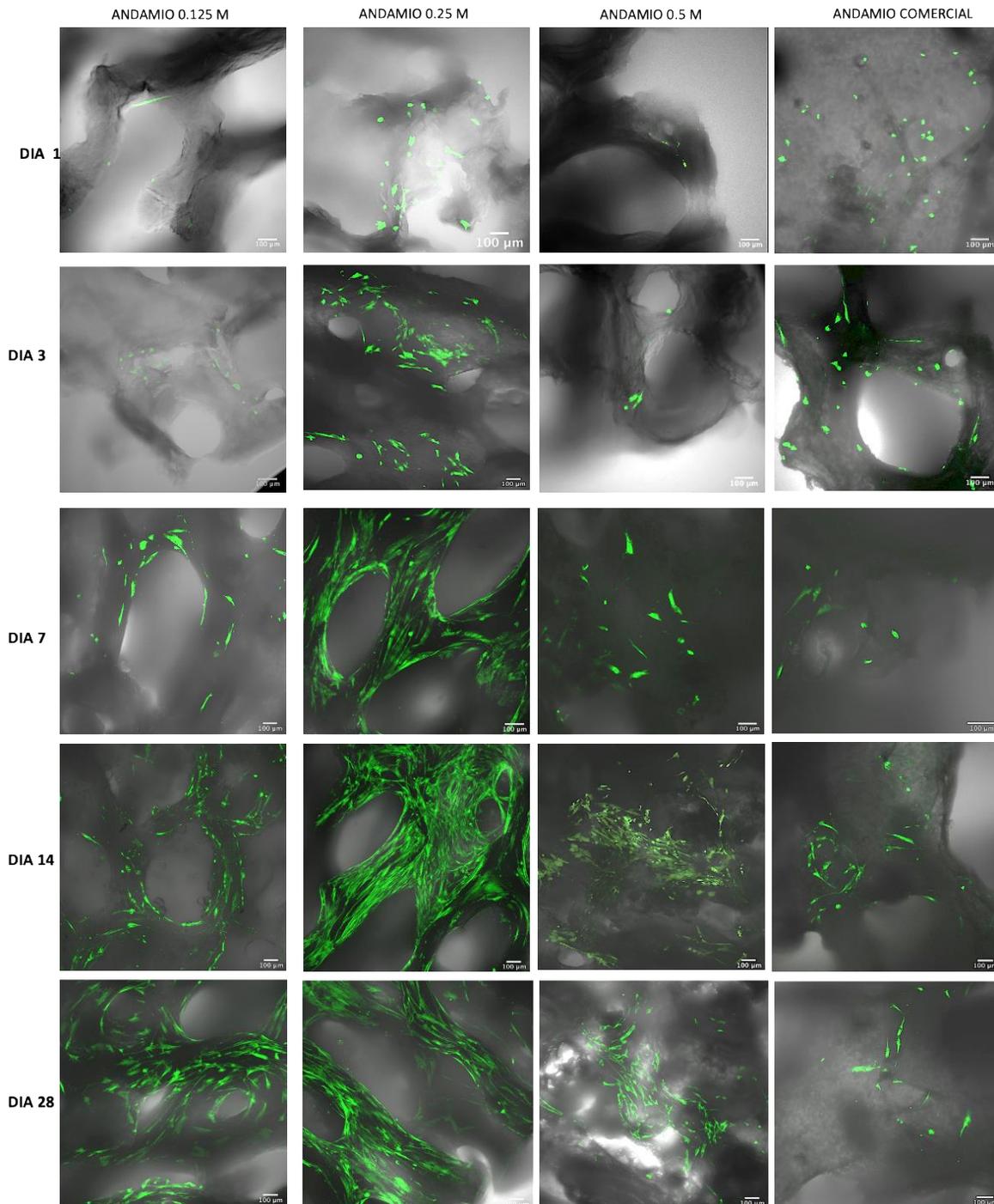


FIGURA 16

Fotomicrografías de las hWJ-MSCs sembradas en los andamios. En los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5, hay células viables y adheridas a todos los tiempos experimentales, observándose la distribución de las células y su localización en la estructura de los andamios. Microscopía confocal. Aumento 40x, barra de escala = 100 µm.

Determinación de la mineralización

Depósito de fosfato de calcio

En la **Error! Reference source not found.** se muestran los resultados obtenidos en los andamios en los que se cultivaron hWJ-MSCs durante 14 y 28 días.

En los andamios de 0.125 M a los 14 días solo se observó una tinción ocre débil en algunas áreas en la periferia de las trabéculas y a los 28 días algunos sitios mostraron una coloración rojiza. En contraste, a los 14 días de cultivo los andamios 0.25 M fueron los únicos en los que se observó una coloración ocre y rojiza y a los 28 días de cultivo se observó una coloración roja y negra que es indicativa de un gran depósito de fosfato de calcio, aunque hay que destacar que los andamios estaban muy quebradizos, por lo que fue difícil obtener los cortes histológicos. Por otra parte, en los andamios de 0.5 M a los 14 días se observó una coloración amarilla en la periferia trabecular y a los 28 días hubo un aumento considerable en la extensión de la coloración ocre en la periferia trabecular. En todo el tejido restante, se observó una coloración roja clara. Sin embargo, cabe destacar los cambios en la estructura trabecular y la degradación de los andamios de este último grupo.

Los andamios 0.25 M conservaron sus capacidades osteoconductoras y osteoinductivas. Cuando fueron sembrados con hWJ-MSC su capacidad de diferenciación osteogénica fue evidente y el compromiso del linaje osteogénico pudo detectarse mediante la mineralización de la MEC con base en el indicativo de depósito de fosfato de calcio con tinción de von Kossa.

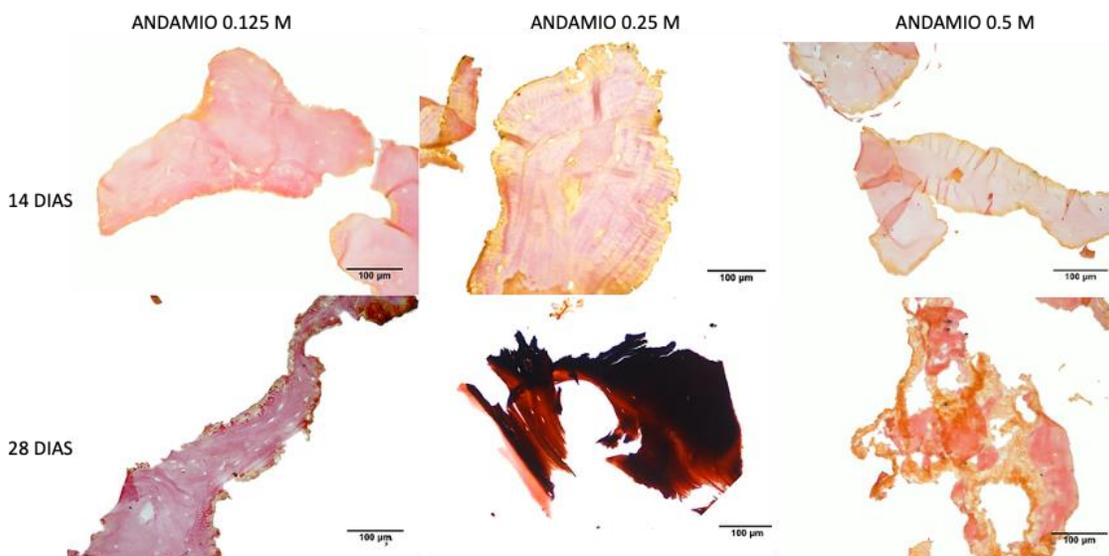


FIGURA 20

Fotomicrografías de cortes histológicos de los andamios sembrados con hWJ-MSCs y teñidos con von Kossa. Detección de depósito mineral: colágena (rosa), osteoide (rojo), calcio (negro). Utilizamos la visualización de depósitos de calcio, teñidos con la técnica de von Kossa, como indicador de diferenciación de las hWJ-MSC cultivadas en los andamios sin un medio inductor de mineralización. Como control se utilizó hueso bovino descalcificado. Microscopía óptica. Aumento 40x barra de escala =100 µm.

Discusión

Ya que en este trabajo se evaluó la desmineralización de la matriz extracelular ósea bovina a concentraciones menores de HCl que las reportadas por otros autores y que realizamos otros tratamientos tanto para descelularizar la matriz extracelular ósea como para hidrolizar a la colágena, es importante comparar los resultados de los tres andamios entre sí.

Los resultados del análisis histológico y las tinciones de DAPI y tricrómica de Masson observamos que en los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M no hay núcleos celulares o material nuclear y que están compuestos principalmente de matriz extracelular desmineralizada. En todos los andamios se logró descelularizarlos de acuerdo con los parámetros establecidos previamente por otros autores (Gilbert, Sellaro y Badylak 2006; Badylak, Freytes y Gilbert 2009; Badylak, Taylor y Uygun 2011; Crapo, Gilbert y Badylak 2011; Tronci 2019; Carvalho *et al.* 2021). Sin embargo, existe mucha controversia sobre la efectividad de los métodos de descelularización versus la pérdida de estructura de la MEC (Tronci 2019). Por lo anterior, en el presente estudio realizamos una combinación de métodos: ciclos de congelación-descongelación, agitación mecánica, usamos ácido clorhídrico, tritón X-100, dodecil sulfato de sodio, ácido etilendiamino tetra acético e hidróxido de sodio; usamos una combinación de diferentes métodos con la intención de usar concentraciones bajas de los tenso activos iónicos y no iónicos SDS y tritón X-100 respectivamente, que son muy efectivas pero también las más agresivas con las proteínas de la MEC ósea (Yang *et al.* 2021). Al parecer, el efecto en los andamios de cada técnica y reactivo respecto a la descelularización utilizando como indicador DAPI proporcionaron evidencia suficiente de que no era necesario cuantificar el contenido de dsADN de los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M, ya que no se encontraron núcleos ni una marca azul en ellos que pudiera atribuirse a la detección de material nuclear o dsADN, se ha indicado que ante la presencia de material nuclear o dsADN se debe cuantificar el dsADN y debe contener menos de 50 ng de ADNds por mg de peso seco (Moharamzadeh 2017). En contraste, en el hueso bovino y los andamios comerciales se observó la presencia de núcleos celulares.

En cuanto a la morfología y estructura histológica de los andamios, esperábamos cambios dependientes de la concentración de HCl usada para la obtención de los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M, ya que se ha estudiado ampliamente la desnaturalización de la colágena tipo I (Ramadass *et al.* 2014; Tronci, 2019; Yang *et al.* 2021). Por lo que los cambios estructurales más aparentes se observan en los andamios 0.5 M y pueden atribuirse a una mayor concentración de ácido clorhídrico (Figueiredo, 2011). Por lo contrario, los andamios 0.125 M son los que más conservaron la estructura; sin embargo, después de realizar los métodos de obtención de los andamios, la estructura de las trabéculas se conservó en todos los andamios.

Consideramos que los métodos de procesamiento del hueso bovino son efectivos para preservar la estructura de la matriz extracelular ósea, la interconexión de poros y macroporos de más de 300 μm en los andamios 0.125 M, 0.25 M y en los 0.5 M, sin embargo es evidente que hay una relación entre el diámetro de poro y la concentración de HCl usada para su obtención, por lo que en los andamios 0.5 M es donde encontramos los poros de menor diámetro, mientras que en los andamios 0.125 M encontramos los

poros de mayor diámetro. Aunque tras el proceso de desmineralización, se conservó la microestructura de la matriz extracelular ósea orgánica, la exposición prolongada de la matriz extracelular ósea orgánica a altas concentraciones de HCl puede causar varias alteraciones morfológicas e histológicas que han sido descritas por Figueiredo, 2011; de hecho, provoca un cierto grado de contracción como consecuencia de la eliminación ácida de la fase mineral ósea que a su vez hace que el hueso pierda la mayor parte de su dureza y resistencia a la compresión, grosor de sus trabéculas, provocando la deformación y colapso de las trabéculas, estos cambios los pudimos observar en los andamios 0.5 M y relacionarlos con la concentración mayor de HCl.

La MEC ósea desmineralizada se obtiene comúnmente del hueso cortical, en donde se realiza la desmineralización mediante extracción ácida y finalmente se esteriliza. En este trabajo nosotros usamos el hueso esponjoso por ser el que más retiene los componentes de la MEC ósea (Li *et al.* 2019). Varios autores han reportado que el ácido ideal para desmineralizar es ácido clorhídrico a una concentración de 0.6 M (Figueiredo, 2011) (Zhu, 2017) (Li, 2019). Sin embargo, después de la desmineralización, se ha determinado que muchos productos comerciales sufren cambios en sus propiedades físicas, químicas, biológicas y mecánicas, respecto a las propiedades del hueso, con el consiguiente impacto en los resultados clínicos obtenidos.

En este trabajo logramos desmineralizar con éxito los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M empleando 3 concentraciones diferentes de ácido clorhídrico, las cuales son más bajas que las establecidas previamente por otros autores (Figueiredo, 2011) (Zhu, 2017) (Li Q., 2018) y por un período de 24 horas en combinación con EDTA. Podemos atribuir la desmineralización en menor tiempo 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M y usando una concentración menor de HCl a la combinación de HCl y EDTA para eliminar las dos fases diferentes de los fosfatos de calcio.

Al relacionar nuestros resultados de EDS y de la tinción tricrómica de Masson, encontramos que en el andamio 0.125 M teñido con tricrómica de Masson hubo mineralización remanente después del procesamiento de obtención de los andamios. Esta mineralización no fue detectada por EDS ya que el límite de detección para materiales 3D es 0.1% en peso, por lo tanto, no se pudieron detectar elementos en concentraciones traza (concentraciones por debajo de 0.01% en peso) (Nasrazadani, 2016). Además, es importante hacer notar que en los análisis químicos por EDS el pico de magnesio permaneció bien definido en los andamios de 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M, sin embargo, no se observan picos de calcio en ninguno de los andamios.

Por otra parte se ha reportado que la degradación del ión magnesio induce el depósito de fosfato de calcio (Kawamura *et al.* 2020) y que preservar el magnesio puede ser favorable para la mineralización y la osteogénesis (Kawamura *et al.* 2020), lo que podría beneficiar la remodelación ósea (Blair *et al.* 2018). En este sentido, hay investigaciones que han utilizado varios elementos bioactivos como magnesio y zinc y los incorporaron en las superficies de los andamios para promover la osteointegración y favorecer la reparación ósea (Li *et al.* 2022). Además, se ha reportado que las células periósticas humanas expuestas al magnesio, muestran una mayor expresión de genes y proteínas osteogénicas (Kawamura *et al.* 2020), por lo que de acuerdo a Amiryaghoubi *et al.* (2020) y Kawamura *et al.* (2020) la presencia del magnesio puede ser favorable en los andamios obtenidos en el presente estudio.

Los resultados del presente trabajo brindan evidencia suficiente de que el componente principal de los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M es colágena tipo I, la cual está hidrolizada en diferentes grados, sin embargo, no se realizó ninguna prueba para determinar su peso molecular.

Por otra parte, los cambios conformacionales debido a la desnaturalización de la colágena tipo I están asociados con las intensidades relativas de las bandas en 859 cm^{-1} , 932 cm^{-1} , $1256\text{ y }1279\text{ cm}^{-1}$ (amida III) y 1669 cm^{-1} (amida I). de bandas a 859 cm^{-1} , 932 cm^{-1} , $1256\text{ y }1279\text{ cm}^{-1}$ (amida III), y 1669 cm^{-1} (amida I). El esqueleto de la proteína es una cadena polipeptídica responsable de determinar el pliegue de una proteína y proporciona su forma general o estructura terciaria. Las bandas de amida III e I son especialmente útiles para el análisis conformacional de la colágena porque brindan información sobre los cambios conformacionales de las moléculas de colágeno y las estructuras secundarias, como hélices α , láminas β , giros β y bucles aleatorios (Unal *et al.* 2021).

También la FT-IR se empleó para confirmar la composición química de los andamios 0.5 M, 0.25 M y 0.125 M y la ausencia de residuos de los reactivos utilizados durante el procesamiento.

Hubo una diferencia muy notable en los andamios 0.25 M en las bandas 1030 , 1059 y 1083 cm^{-1} , las cuales estuvieron bien definidas en contraste con los otros grupos de andamios. Estas bandas se relacionaron con vibraciones de estiramientos C-OH de las glicoproteínas que son componentes de la matriz extracelular ósea, entre ellas la osteonectina, la fosfatasa alcalina y proteínas con el motivo RGD como fibronectina, fibrinógeno, osteopontina, vitronectina y sialoproteínas óseas (BMP) (Taubenberger *et al.* 2010; Paolillo *et al.* 2018; Hedhammar, 2019; Salifu *et al.* 2020)

El grado de desnaturalización de la colágena podría estar asociado principalmente con cambios en las bandas relacionadas con el anillo de piridina, hidroxiprolina y cadenas laterales de prolina donde los tres están involucrados en la estructura de triple hélice de la colágena sin desnaturalizar (Unal *et al.* 2021).

Por otro lado, la presencia de bandas bien definidas asociadas a proteoglucanos a 1070 cm^{-1} en los andamios 0.25 M podría ser determinante para lograr osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis en este estudio y se discutirá más adelante.

En cuanto a las propiedades mecánicas, particularmente el módulo de Young, son características esenciales para la biocompatibilidad. Las células son capaces de detectar las propiedades mecánicas del microambiente y también afectan el comportamiento celular a través de la mecanotransducción de la matriz celular (Rho *et al.* 1998; Cuppone *et al.* 2004; Yen *et al.* 2020).

Se esperaban estos resultados al realizar la microindentación en los andamios, ya que, como han informado anteriormente (Currey 2006; Ma *et al.* 2020), existen diferentes variables que intervienen en las medidas obtenidas en una región elegida aleatoriamente, como el ancho de la trabécula, el número y tamaño de los poros cercanos (Nyman *et al.* 2016; Ballesta *et al.* 2020; Salifu *et al.* 2020; Koolen *et al.* 2020). Los valores del módulo elástico obtenidos en los andamios 0.125, 0.25 y 0.5 M medidos aquí parecen inferiores a los encontrados por otros autores en los que se encontraron valores de hasta GPa (Ma *et al.* 2020; Yen *et al.* 2020). Sin embargo, coinciden con los resultados obtenidos en otro estudio en el que los módulos de Young tenían un valor de 200-300 MPa utilizando tensión de tracción uniaxial (Summitt, 2003).

Las propiedades mecánicas de los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M son diferentes porque dependen en gran medida de la integridad de las fibras colágenas, su desnaturalización, la hidratación y la porosidad (Mandair y Morris 2015), (Unal y Akkus 2015)., (Unal, Jung y Akkus 2016) (Han *et al.* 2011; Wang *et al.* 2016; Egorikhina *et al.* 2021). Por lo que la gran desviación estándar encontrada en los resultados confirma una gran heterogeneidad en los andamios, situación que se esperaba para los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M porque podrían ocurrir variaciones tanto en la disposición de las fibras de colágena como de las trabéculas, la direccionalidad de las fibras de colágena en las trabéculas en el sitio medido y los macroporos en la estructura Summitt *et al.* (2003) demostraron que el hueso al ser un material biológico, también se relaja porque tiene propiedades visco elásticas; las cuales no fueron caracterizadas en este estudio. Esto puede explicar aún más la variabilidad de los resultados. Dicho esto, los resultados se obtuvieron con exactamente las mismas condiciones de medición en todos los andamios y, por lo tanto, proporcionan evidencia suficiente para comparar los diferentes materiales probados. En general, el módulo de elasticidad parece ser inversamente proporcional a la concentración de ácido clorhídrico usada para la obtención de los andamios.

Por otra parte, el método de obtención del andamio comercial no se conoce con precisión y la evaluación de su microestructura estaba más allá del alcance de esta investigación.

Las propiedades del hueso mineralizado son diferentes de las propiedades de los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M; en el hueso, la capacidad de absorción de las fibras de colágena es limitada debido a la estructura bien organizada de los materiales inorgánicos. En general, después de la desmineralización con ácido clorhídrico se conservó principalmente la MEC ósea orgánica, la cual, está compuesta por proteínas, sin embargo, también hay una extracción, solubilización o desnaturalización de proteínas asociadas a la fase mineral (Granke, Does y Nyman 2015; Wang *et al.* 2016; Wang *et al.* 2018) entre las que se encuentran la colágena tipo I y los proteoglicanos (Dong y Lv 2016; Zhu *et al.* 2017) (Iozzo y Schaefer 2015) (Ramadass *et al.* 2014).

Por otro lado, como se ha enfatizado anteriormente, los proteoglicanos dan a la matriz extracelular resistencia a las fuerzas compresivas al retener la hidratación de las fibras, pero el HCl es capaz de solubilizar los proteoglicanos (Mulyani *et al.* 2017) (Humphrey, Dufresne y Schwartz 2014).

Por lo que podemos decir que todos los andamios conservaron la capacidad de absorción y los cambios en la capacidad de absorción entre los diferentes grupos de los andamios está relacionada a la proporción de proteoglicanos, pero el factor determinante es el grado de hidrólisis de la colágena, puesto que en el andamio 0.5 M expuesto a la mayor concentración de HCl es en el que hay una mayor capacidad de absorción que los grupos de andamios. 0.125 y 0.25 M, los cuales fueron expuestos a una concentración menor de HCl y les podemos atribuir menor grado de hidrólisis de la proteína colágena, la cual se determinó como componente principal de los andamios.

La enzima colagenasa provoca la degradación de la triple hélice de la colágena (Yang *et al.* 20121), se ha reportado que los agregados de moléculas de la colágena tipo I se degradan comenzando desde el exterior (Jabłońska-Trypuć, Matejczyk y Rosochacki 2016), nosotros pudimos ver este mismo efecto en los andamios tanto en las fotomicrografías obtenidas mediante MEB como en los cortes histológicos, en donde los

andamios 0.5 M fueron los primeros en degradarse en 7 días, mientras que los andamios 0.125 M y 0.25 M conservaron aproximadamente el 20 % de su peso después de 21 días en el búfer de degradación, por lo que usar concentraciones mayores a 0.25 M de HCl para desmineralizar el hueso esponjoso bovino acelera drásticamente la degradación de los andamios obtenidos.

El aislamiento de hWJ-MSCs requiere un método eficiente y reproducible, los reportes de y (Komatsu *et al.* 2018; Kosinski *et al.* 2020) han sido usados exitosamente; sin embargo, el cambio de condiciones en el microambiente de la placa de cultivo en el que se expanden y cultivan las hWJ-MSCs al cambio en el microambiente al sembrarlas en los andamios es capaz de modificar su fenotipo, tasa y velocidad de proliferación y diferenciación. Las células se observaron después de 5 a 7 días de cultivo de los explantes, los cuales retiramos entre los 7 y 10 días de cultivo (Hendijani, 2017). La morfología de las hWJ-MSCs adheridas a la botella de cultivo es la típica de fibroblastos. En cultivo, las hWJ-MSCs tienden a ser localmente confluentes, formando distintas colonias y alcanzando en aproximadamente 10 días el 70-80% de confluencia, se recolectaban y expandían para su posterior uso. Cabe destacar que estas células no expresan marcadores de linaje hematopoyético típicos y generalmente se identifican mediante una combinación limitada de propiedades físicas, fenotípicas y funcionales definidas. Después de establecer el cultivo primario, mantuvimos las hWJ-MSCs a una confluencia de 70-80% porque se ha propuesto que un tiempo de cultivo prolongado puede provocar la modificación de la expresión génica, los marcadores de células troncales y la capacidad de diferenciación. Las MSCs se pueden dividir en dos clases: MSCs adultas y fetales / perinatales; las hWJ- MSCs se consideran MSCs derivadas del feto.

Por otra parte, los análisis mediante citometría de flujo revelaron que las hWJ-MSCs en pase 3 cumplen los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). Estos criterios mínimos hacen referencia a las características del cultivo de las MSC (Dominici *et al.* 2006; Subramanian *et al.* 2015).

Los hallazgos de este trabajo confirmaron que la población de hWJ-MSCs en pase 3 analizada mediante citometría de flujo el 98% fueron positivas a CD 90, el 96% fueron positivas a CD73 y el 85.6 fueron positivas a CD 105, mientras que el 4% fueron positivas a CD19, el 3.1% fueron positivas a CD 34, 7.9% fueron positivas a HLA-DR, el 0.05% fueron positivas a CD11b, el 0.2% fueron positivas a CD45 y finalmente el 0.03% fueron positivas a HLA-ABC, aunque se ha determinado previamente que menos el 20 % de las células deben expresar el marcador para que se consideren positivas para el panel de inmunofenotipificación (Ansari *et al.* 2018) (Cabrera-Perez *et al.* 2019) (Pan *et al.* 2021); por lo que los únicos marcadores a los que podemos considerar positivas a las hWJMSC son CD 90, CD 73 y CD 105. Cabe mencionar que tampoco existe actualmente un consenso sobre el porcentaje de cada marcador y también se ha observado una variabilidad tanto entre los pases de cultivo de las hWJMSC como en las condiciones de su cultivo inmunofenotipificación (Ansari *et al.* 2018) (Cabrera-Perez *et al.* 2019) (Pan *et al.* 2021

En cuanto a la adhesión celular, a los 7 días de cultivo encontramos hWJ-MSC viables y adheridas, sin embargo, en los andamios 0.125 M y 0.25 M hubo una mayor expresión de CD51, por lo que podríamos asumir que son la que exponen la mayor cantidad de motivos RGD.

Los resultados sugieren que las concentraciones de HCl 0.125 M y 0.25 M son las óptimas para desnaturalizar de la colágena tipo I y exponer sitios RDG que son crípticos en la estructura de triple hélice de la colágena ya que hay una mayor expresión de CD51 (Paolillo et al. 2018). Se ha reportado que la desnaturalización de la colágena tipo I favorece la exposición de motivos RGD que están encriptados en la estructura de triple hélice, ya que al desenroscar la estructura mediante la desnaturalización, estas secuencias quedan expuestas en las cadenas de la colágena tipo I (Hotchkiss, Matthias, and Hogg 1998). En contraste, los andamios 0.5 M solo conservaron motivos RGD en algunas áreas centrales de las trabéculas, ya que como se ha mencionado anteriormente el HCl desnaturaliza de la parte más externa al interior de la estructura de triple hélice de la colágena tipo I y probablemente después de que la mayoría de los motivos RGD fueran expuestos en un momento preciso del procesamiento de obtención de los andamios, al mantenerse en contacto con una mayor concentración de HCl contribuyó a la pérdida o daño de la secuencia.

El andamio representa un cambio en el microambiente celular porque previamente sembramos en matraz de cultivo con mayor rigidez que todos los andamios (Figura 15). Previo al cultivo de las hWJ-MSCs, las suspendimos en medio de cultivo DMEM-F12, la suspensión celular se mantuvo dentro del andamio por fuerza capilar, de modo que la fuerza capilar es la que permitió inicialmente que las hWJ-MSCs establecieran contactos de baja afinidad seguidos de una adhesión firme mediada por integrinas por el hecho de que la adhesión celular es un proceso dinámico y complejo (Szekacs et al.2018).

Estos hallazgos son evidentes también en la morfología celular de las hWJ-MSCs ya que a los días 1 y 3 de cultivo aun observamos algunas hWJ-MSCs de morfología redondeada, pero a partir del día 7 de cultivo, la mayoría de las hWJ-MSC son de morfología fibroblástica que es característica en los andamios 0.25 M, esto se puede atribuir a la fase de adhesión celular firme (Szekacs et al.2018) y a una mayor afinidad por el andamio.

Los resultados de los ensayos de citocompatibilidad de los andamios mostraron que hubo un mayor número de células adheridas a los andamios 0.25 M a todos los días de cultivo y que estas células tienen una adhesión preferencial que sigue el paralelismo de las fibras colágenas que conforman el andamio y que podría actuar como plantilla para la reparación y reconstrucción funcional del tejido óseo tridimensional. En los estudios realizados en el presente trabajo, el potencial de diferenciación osteogénica de hWJ-MSCs fue evidente en ausencia de medio inductor de mineralización. El potencial de diferenciación osteogénica de las MSC perinatales concuerda con el hecho de que tienen un potencial terapéutico osteogénico superior al de las MSC adultas (Cabrera-Pérez, 2019). Se ha demostrado que las MSC perinatales tienen niveles más altos de expresión entre los 16 genes osteogénicos (Zimmermann, 2011), y tienen niveles más altos de depósitos de calcio y actividad de fosfatasa alcalina más alta (Borie, 2011). Estos hallazgos se correlacionan con los nuestros, ya que la tinción de von Kossa es altamente reproducible

y técnica ampliamente utilizada para determinar la presencia de depósitos de fosfato cálcico y osteoide en la ingeniería de tejido óseo a pesar de la dificultad de generar finos cortes de andamios y su evidente fragilidad.

Finalmente, nuestros hallazgos indican que las hWJ-MSCs retienen la potencia para la diferenciación osteogénica en ausencia de un medio inductor de la mineralización, lo cual también es indicativo de que se preservó la capacidad osteoinductiva de la matriz extracelular ósea (Urist, 1973) que es el componente principal de los andamios, en donde las integrinas actúan como receptores celulares a través del motivo RGD. Las características fundamentales de estos receptores son su capacidad para transducir señales en la célula y cascadas de señales inducidas por diferentes factores de crecimiento (Hoyos-Nogues et al. 2019). Pudimos asociar la presencia de motivos RGD en los andamios de 0,25 M en función de la adhesión celular observada (Paolillo, 2018) (Kosinski, 2020) (Barradas, 2011) y mediante la diferenciación de hWJ-MSC (Paolillo, 2018) (Baba, 2012). Usamos la deposición de fosfato de calcio en andamios como un indicador de diferenciación celular en andamios usando tinción de von Kossa.

Conclusiones

1. Las concentraciones 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M de HCl son efectivas para desmineralizar el hueso esponjoso bovino.
2. Los andamios de 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M retienen la estructura tridimensional y los macro poros interconectados.
3. El componente principal de los andamios 0.125 M, 0.25 M y 0.5 M es colágena tipo I.
4. Las hWJ-MSCs en pase 3 fueron positivas para los marcadores mesenquimales CD 73, CD 90, CD 105, negativas para los marcadores hematopoyéticos CD 34, CD 45, CD 11b, CD 19 y antígenos leucocitarios humanos HLA-DR y HLA-ABC.
5. En los andamios 0.125 M y 0.25 M hubo una mayor expresión de CD 51.
6. En los andamios 0.25 M hubo un mayor número de células viables desde el día 3 hasta el día 28 de cultivo que en los andamios 0.125 M, 0.25 M, 0.5 M y el andamio comercial.
7. En los andamios 0.25 M sobre los que sembramos las células fue en los únicos que hubo depósito de fosfato de calcio después de 28 días de cultivo en ausencia de un medio inductor de la mineralización; por lo tanto es el único andamio al que se le pueden atribuir propiedades osteoconduvtivas, osteoinductivas y osteogénicas.

Perspectivas

Las perspectivas del trabajo son alentadoras, ya que los resultados indican que los andamios en conjunto con las hWJ-MSCs lograron depósitos de fosfato de calcio en 28 días en ausencia de medio inductor de la mineralización, sin embargo, aún falta terminar la fase preclínica y posteriormente la fase clínica de la investigación, por lo que tomará

aproximadamente 8 años terminar todas las pruebas que demuestren su seguridad y efecto de los andamios y finalmente podrían ser aprobados para su uso clínico por Cofepris. Aunque cabe resaltar el impacto positivo que tendría el éxito clínico de este andamio disponible en México para la reparación de defectos óseos críticos.

Referencias

1. Abedin, E., R. Lari, N. Mahdavi Shahri, and M. Fereidoni. 2018. 'Development of a demineralized and decellularized human epiphyseal bone scaffold for tissue engineering: A histological study', *Tissue Cell*, 55: 46-52.
2. Amiryaghoubi, N., M. Fathi, N. N. Pesyan, M. Samiei, J. Barar, and Y. Omid. 2020. 'Bioactive polymeric scaffolds for osteogenic repair and bone regenerative medicine', *Med Res Rev*.
3. Ansari, A. S., M. D. Yazid, Nqav Sainik, R. A. Razali, A. B. Saim, and R. B. H. Idrus. 2018. 'Osteogenic Induction of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell for Bone Regeneration: A Systematic Review', *Stem Cells Int*, 2018: 2406462.
4. Arai, Y., Choi, B., Kim, B. J., Park, S., Park, H., Moon, J. J., & Lee, S. H. (2021). Cryptic ligand on collagen matrix unveiled by MMP13 accelerates bone tissue regeneration via MMP13/Integrin α 3/RUNX2 feedback loop. *Acta biomaterialia*, 125, 219-230.
5. Armstrong, J. P., & Stevens, M. M. (2020). Using remote fields for complex tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 38(3), 254-263.
6. Aslan, H., Zilberman, Y., Kandel, L., Liebergall, M., Oskouian, R. J., Gazit, D., & Gazit, Z. (2006). Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow derived CD105+ cells. *Stem cells*, 24(7), 1728-1737.
7. Atala, A. &. (2015). *Translational regenerative medicine*. Academic Press.
8. Baba, K., Y. Yamazaki, S. Ikemoto, K. Aoyagi, A. Takeda, and E. Uchinuma. 2012. 'Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived autoserum', *J Craniomaxillofac Surg*, 40: 768-72.
9. Badylak, S. F., D. Taylor, and K. Uygun. 2011. 'Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds', *Annu Rev Biomed Eng*, 13: 27-53.
10. Ballesta, S., R. C. Guerri-Fernandez, J. J. Chillaron, A. Guell, S. Herrera, E. Torres, N. G. Ascoeta, J. A. Flores Leroux, and A. Diez. 2020. 'The use of microindentation for the study of bone properties in type 1 diabetes mellitus patients', *Osteoporos Int*, 31: 175-80.

11. Blair, H. C., Q. C. Larrouture, I. L. Tourkova, L. Liu, J. H. Bian, D. B. Stolz, D. J. Nelson, and P. H. Schlesinger. 2018. 'Support of bone mineral deposition by regulation of pH', *Am J Physiol Cell Physiol*, 315: C587-c97.
12. Brooker, C., & Tronci, G. 2022. Effect of Mammalian Tissue Source on the Molecular and Macroscopic Characteristics of UV-Cured Type I Collagen Hydrogel Networks. *Prosthesis*, 4(1), 1-14.
13. Cabrera-Perez, R., M. Monguio-Tortajada, A. Gamez-Valero, R. Rojas-Marquez, F. E. Borrás, S. Roura, and J. Vives. 2019. 'Osteogenic commitment of Wharton's jelly mesenchymal stromal cells: mechanisms and implications for bioprocess development and clinical application', *Stem Cell Res Ther*, 10: 356.
14. Carvalho, M. S., Cabral, J., da Silva, C. L., & Vashishth, D. (2021). Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: creating new bone by mimicking the extracellular matrix. *Polymers*, 13(7), 1095.
15. Chamieh, F. C. (2016). Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Scientific reports.*, 6, 38814.
16. Chen, B., Lin, H., Wang, J., Zhao, Y., Wang, B., Zhao, W., & Dai, J. (2007). Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials*, 28(6), 1027-1035.
17. Chen, G., and Y. Lv. 2018. 'Decellularized Bone Matrix Scaffold for Bone Regeneration', *Methods Mol Biol*, 1577: 239-
18. Chen, S., Wang, H., Mainardi, V. L., Talò, G., McCarthy, A., John, J. V., ... & Xie, J. (2021). Biomaterials with structural hierarchy and controlled 3D nanotopography guide endogenous bone regeneration. *Science Advances*, 7(31), eabg3089.
19. Cho, L. R., D. G. Kim, J. H. Kim, E. S. Byon, Y. S. Jeong, and C. J. Park. 2010. 'Bone response of Mg ion-implanted clinical implants with the plasma source ion implantation method', *Clin Oral Implants Res*, 21: 848-56.
20. Cuppone, M., B. B. Seedhom, E. Berry, and A. E. Ostell. 2004. 'The longitudinal Young's modulus of cortical bone in the midshaft of human femur and its correlation with CT scanning data', *Calcif Tissue Int*, 74: 302-9.
21. Currey, John D. 2006. *Bones: structure and mechanics* (Princeton university press).
Cypher, Thomas J, and Jordan P Grossman. 1996. 'Biological principles of bone graft healing', *The Journal of foot*

and ankle surgery, 35: 413-17.

22. Damania, A., Kumar, A., Teotia, A. K., Kimura, H., Kamihira, M., Ijima, H., ... & Kumar, A. (2018). Decellularized liver matrix-modified cryogel scaffolds as potential hepatocyte carriers in bioartificial liver support systems and implantable liver constructs. *ACS applied materials & interfaces*, 10(1), 114-126.

23. Deschaseaux, F., Sensébé, L., & Heymann, D. (2009). Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends in molecular medicine*, 15(9), 417-429.

24. Dominici, MLBK, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop, and EM Horwitz. 2006. 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8: 315-17.

25. Dong, Chanjuan, and Yonggang Lv. 2016. 'Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives', *Polymers*, 8: 42.

26. Egorikhina, M. N., Semenycheva, L. L., Chasova, V. O., Bronnikova, I. I., Rubtsova, Y. P., Zakharychev, E. A., & Aleynik, D. Y. (2021). Changes in the molecular characteristics of bovine and marine collagen in the presence of proteolytic enzymes as a stage used in scaffold formation. *Marine Drugs*, 19(9), 502.

27. Figueiredo, Margarida, Sara Cunha, Gabriela Martins, Joao Freitas, Fernando Judas, and Helena Figueiredo. 2011a. 'Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone', *Chemical Engineering Research & Design - CHEM ENG RES DES*, 89: 116-24.

28. Figueiredo, Margarida, Sara Cunha, Gabriela Martins, João Freitas, Fernando Judas, and Helena Figueiredo. 2011b. 'Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone', *Chemical Engineering Research and Design*, 89: 116-24.

29. Ghayor, C., and F. E. Weber. 2018. 'Osteoconductive Microarchitecture of Bone Substitutes for Bone Regeneration Revisited', *Front Physiol*, 9: 960.

30. Gilbert, T. W., T. L. Sellaro, and S. F. Badylak. 2006. 'Decellularization of tissues and organs', *Biomaterials*, 27: 3675-83.

31. Gilpin, Anna, and Yong Yang. 2017. 'Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications', *BioMed research international*, 2017: 9831534-34.

32. Granke, Mathilde, Mark D Does, and Jeffrey S Nyman. 2015. 'The role of water compartments in the material properties of cortical bone', *Calcified tissue*

international, 97: 292-307.

33. Hassani, A., Khoshfetrat, A. B., Rahbarghazi, R., & Sakai, S. (2022). Collagen and nano-hydroxyapatite interactions in alginate-based microcapsule provide an appropriate osteogenic microenvironment for modular bone tissue formation. *Carbohydrate Polymers*, 277, 118807.

34. Hayashi, K., M. L. Munar, and K. Ishikawa. 2020. 'Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 111: 110848.

35. Hedhammar, My. 2019. "Cyclic RGD cell-binding motif and uses thereof." In.: Google Patents.

36. Hendijani F. (2017). Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell proliferation*, 50(2).

37. Heuschkel, M. A., Leitolis, A., Roderjan, J. G., Suss, P. H., Luzia, C. A. O., da Costa, F. D. A., ... & Stimamiglio, M. A. (2019). In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering. *Xenotransplantation*, 26(2), e12464.

38. Hotchkiss, Kylie A, Lisa J Matthias, and Philip J Hogg. 1998. 'Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1388: 478-88.

39. Hoyos-Nogues, M., E. Falgueras-Batlle, M. P. Ginebra, J. M. Manero, J. Gil, and C. Mas-Moruno. 2019. 'A Dual Molecular Biointerface Combining RGD and KRSR Sequences Improves Osteoblastic Functions by Synergizing Integrin and Cell-Membrane Proteoglycan Binding', *Int J Mol Sci*, 20.

40. Humphrey, Jay D., Eric R. Dufresne, and Martin A. Schwartz. 2014. 'Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15: 802-12.

41. Hwang, Jeongmin, Boi Hoa San, Neill J Turner, Lisa J White, Denver M Faulk, Stephen F Badylak, Yang Li, and S Michael Yu. 2017. 'Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide', *Acta biomaterialia*, 53: 268-78.

42. Iozzo, Renato V, and Liliana Schaefer. 2015. 'Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans', *Matrix Biology*, 42: 11-55.

43. Jabłońska-Trypuć, Agata, Marzena Matejczyk, and Stanisław Rosochacki. 2016. 'Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs', *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31: 177-83.
44. Kawamura, N., Y. Nakao, R. Ishikawa, D. Tsuchida, and M. Iijima. 2020. 'Degradation and Biocompatibility of AZ31 Magnesium Alloy Implants In Vitro and In Vivo: A Micro-Computed Tomography Study in Rats', *Materials (Basel)*, 13.
45. Kochetkova, T., Peruzzi, C., Braun, O., Overbeck, J., Maurya, A. K., Neels, A., ... & Schwiedrzik, J. (2021). Combining polarized Raman spectroscopy and micropillar compression to study microscale structure-property relationships in mineralized tissues. *Acta biomaterialia*, 119, 390-404.
46. Komatsu, N., M. Kajiya, S. Motoike, M. Takewaki, S. Horikoshi, T. Iwata, K. Ouhara, K. Takeda, S. Matsuda, T. Fujita, and H. Kurihara. 2018. 'Type I collagen deposition via osteoinduction ameliorates YAP/TAZ activity in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes', *Stem Cell Res Ther*, 9: 342.
47. Kono, T., Sakae, T., Nakada, H., Kaneda, T., & Okada, H. (2022). Confusion between Carbonate Apatite and Biological Apatite (Carbonated Hydroxyapatite) in Bone and Teeth. *Minerals*, 12(2), 170.
48. Koolen, M., S. Amin Yavari, K. Lietaert, R. Wauthle, A. A. Zadpoor, and H. Weinans. 2020. 'Bone Regeneration in Critical-Sized Bone Defects Treated with Additively Manufactured Porous Metallic Biomaterials: The Effects of Inelastic Mechanical Properties', *Materials (Basel)*, 13.
49. Kosinski, M., A. Figiel-Dabrowska, W. Lech, L. Wieprzowski, R. Strzalkowski, D. Strzemecki, L. Cheda, J. Lenart, K. Domanska-Janik, and A. Sarnowska. 2020. 'Bone Defect Repair Using a Bone Substitute Supported by Mesenchymal Stem Cells Derived from the Umbilical Cord', *Stem Cells Int*, 2020: 1321283.
50. Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. P., & Atala, A. (Eds.). (2020). *Principles of tissue engineering*. Academic press.
51. Li, M., Zhang, T., Jiang, J., Mao, Y., Zhang, A., & Zhao, J. (2019). ECM coating modification generated by optimized decellularization process improves functional behavior of BMSCs. *Materials Science and Engineering: C*, 105, 110039.
52. Li, Q., W. Zhang, G. Zhou, Y. Cao, W. Liu, and Z. Y. Zhang. 2018. 'Demineralized bone matrix-based microcarrier scaffold favors vascularized large bone regeneration in vivo in a rat model', *J Biomater Appl*, 33: 182-95.
53. Li, Y., Liu, X., Gaihre, B., Li, L., Rezaei, A., Miller, A. L., ... & Lu, L.

(2022). Zinc-doped hydroxyapatite and poly (propylene fumarate) nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science*, 1-15.

54. Li, Z., Du, T., Ruan, C., & Niu, X. (2021). Bioinspired mineralized collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive materials*, 6(5), 1491-1511.

55. Ma, S., K. Song, J. Lan, and L. Ma. 2020. 'Biological and mechanical property analysis for designed heterogeneous porous scaffolds based on the refined TPMS', *J Mech Behav Biomed Mater*, 107: 103727.

56. Mansour, A., M. A. Mezour, Z. Badran, and F. Tamimi. 2017. '(*) Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review', *Tissue Eng Part A*, 23: 1436-51.

57. Mauney, J. R., Jaquiéry, C., Volloch, V., Heberer, M., Martin, I., & Kaplan, D. L. (2005). In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(16), 3173-3185.

58. Moharamzadeh, Keyvan. 2017. '9 - Processing and preservation of biomaterials and regulatory issues.' in Lobat Tayebi and Keyvan Moharamzadeh (eds.), *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering* (Woodhead Publishing).

59. Mulyani, Sri, F. Setyabudi, Yudi Pranoto, and Umar Santoso. 2017. 'The effect of pretreatment using hydrochloric acid on the characteristics of buffalo hide gelatin', *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 42: 14.

60. Naso, F., A. Gandaglia, L. Iop, M. Spina, and G. Gerosa. 2012. 'Alpha-Gal detectors in xenotransplantation research: a word of caution', *Xenotransplantation*, 19: 215-20.

61. Nasrazadani, Seifollah, and Shokrollah Hassani. 2016. 'Chapter 2 - Modern analytical techniques in failure analysis of aerospace, chemical, and oil and gas industries.' in Abdel Salam Hamdy Makhlof and Mahmood Aliofkhazraei (eds.), *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Oil and Gas Industry* (Butterworth-Heinemann).

62. Nguyen, M., & Panitch, A. (2022). Proteoglycans and proteoglycan mimetics for tissue engineering. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*.

63. Nyman, J. S., M. Granke, R. C. Singleton, and G. M. Pharr. 2016. 'Tissue-Level Mechanical Properties of Bone Contributing to Fracture Risk', *Curr*

Osteoporos Rep, 14: 138-50.

64. Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E., & Oyen, M. L. (2015). Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 42, 19-25.

65. Oliveira, M. R., Ed Martins, R. Celio-Mariano, C. K. Sonoda, I. Rangel Garcia, Jr., and W. M. de Melo. 2013. 'Tissue engineering: using collagen type I matrix for bone healing of bone defects', *J Craniofac Surg*, 24: e394-6.

66. Pan, L., Liu, C., Liu, Q., Li, Y., Du, C., Kang, X., ... & Zhang, Q. (2021). Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells alleviate concanavalin A-induced fulminant hepatitis by repressing NF- κ B signaling and glycolysis. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 1-14.

67. Paolillo, M., M. C. Galiazzo, A. Daga, E. Ciusani, M. Serra, L. Colombo, and S. Schinelli. 2018. 'An RGD small-molecule integrin antagonist induces detachment-mediated anoikis in glioma cancer stem cells', *Int J Oncol*, 53: 2683-94.

68. Porzionato, A., E. Stocco, S. Barbon, F. Grandi, V. Macchi, and R. De Caro. 2018. 'Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives', *Int J Mol Sci*, 19.

69. Qiu, Z., Park, A., Wang, L., Wilsey, R., & Lee, M. (2022). The RGD (Arg-Gly-Asp) is a potential cell-binding motif of UNC-52/PERLECAN. *Biochemical and biophysical research communications*, 586, 143-149.

70. Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108.

71. Rahman, M., Peng, X. L., Zhao, X. H., Gong, H. L., Sun, X. D., Wu, Q., & Wei, D. X. (2021). 3D bioactive cell-free-scaffolds for in-vitro/in-vivo capture and directed osteoinduction of stem cells for bone tissue regeneration. *Bioactive Materials*, 6(11), 4083-4095.

72. Ramadass, Satiesh Kumar, Sathiamurthi Perumal, Arun Gopinath, Anuya Nisal, Saravanan Subramanian, and Balaraman Madhan. 2014. 'Sol-Gel Assisted Fabrication of Collagen Hydrolysate Composite Scaffold: A Novel Therapeutic Alternative to the Traditional Collagen Scaffold', *ACS applied materials & interfaces*, 6: 15015-25.

73. Rho, Jae-Young, Liisa Kuhn-Spearing, and Peter Zioupos. 1998. 'Mechanical properties and the hierarchical structure of bone', *Medical engineering & physics*, 20: 92-102.

74. Salifu, A. A., J. D. Obayemi, V. O. Uzonwanne, and W.O. Soboyejo. 2020. 'Mechanical stimulation improves osteogenesis and the mechanical properties of osteoblast laden RGD-functionalized polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds', *J Biomed Mater Res A*.
75. Sanden, K. W., Böcker, U., Ofstad, R., Pedersen, M. E., Høst, V., Afseth, N. K., ... & Pleshko, N. (2021). Characterization of collagen structure in normal, wooden breast and spaghetti meat chicken fillets by FTIR microspectroscopy and histology. *Foods*, 10(3), 548.
76. Sarker, Bapi, Wei Li, Kai Zheng, Rainer Detsch, and Aldo R Boccaccini. 2016. 'Designing porous bone tissue engineering scaffolds with enhanced mechanical properties from composite hydrogels composed of modified alginate, gelatin, and bioactive glass', *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2: 2240-54.
77. Subramanian, A., Fong, C. Y., Biswas, A., & Bongso, A. (2015). Comparative characterization of cells from the various compartments of the human umbilical cord shows that the Wharton's jelly compartment provides the best source of clinically utilizable mesenchymal stem cells. *PloS one*, 10(6), e0127992.
78. Szekacs, I., E. Farkas, B. L. Gemes, E. Takacs, A. Szekacs, and R. Horvath. 2018. 'Integrin targeting of glyphosate and its cell adhesion modulation effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells revealed by label-free optical biosensing', *Sci Rep*, 8: 17401.
79. Taubenberger, Anna, Maria Woodruff, Huifen Bai, Daniel Müller, and Dietmar Hutmacher. 2010. 'The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation', *Biomaterials*, 31: 2827-35.
80. Tronci, Giuseppe. 2019. '13 - The application of collagen in advanced wound dressings.' in S. Rajendran (ed.), *Advanced Textiles for Wound Care (Second Edition)* (Woodhead Publishing).
81. Umabayashi, M., S. Ohba, T. Kurogi, S. Noda, and I. Asahina. 2020. 'Full Regeneration of Maxillary Alveolar Bone Using Autogenous Partially Demineralized Dentin Matrix and Particulate Cancellous Bone and Marrow for Implant-Supported Full Arch Rehabilitation', *J Oral Implantol*, 46: 122-27.
82. Unal, M., Ahmed, R., Mahadevan-Jansen, A., & Nyman, J. S. (2021). Compositional assessment of bone by Raman spectroscopy. *Analyst*, 146(24), 7464-7490.
83. Unal, Mustafa, and Ozan Akkus. 2015. 'Raman spectral classification of mineral-and collagen-bound water's associations to elastic and

post-yield mechanical properties of cortical bone', *Bone*, 81: 315-26.

84. Unal, Mustafa, Hyungjin Jung, and Ozan Akkus. 2016. 'Novel Raman spectroscopic biomarkers indicate that postyield damage denatures bone's collagen', *Journal of Bone and Mineral Research*, 31: 1015-25.

85. Urist, Marshall R, Hisashi Iwata, Peter L Ceccotti, Robert L Dorfman, Stuart D Boyd, Richard M McDowell, and Constance Chien. 1973. 'Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3511-15.

86. Vidal Bde, C. 2014. 'Fluorescence, aggregation properties and FT-IR microspectroscopy of elastin and collagen fibers', *Acta Histochem*, 116: 1359-66.

87. Vidal Bde, C., and M. L. Mello. 2011. 'Collagen type I amide I band infrared spectroscopy', *Micron*, 42: 283-9.

88. Wang, Xiaodu, Haoran Xu, Yehong Huang, Sumin Gu, and Jean X Jiang. 2016. 'Coupling effect of water and proteoglycans on the in-situ toughness of bone', *Journal of Bone and Mineral Research*, 31: 1026-29.

89. Wobma, H., & Vunjak-Novakovic, G. 2016. Tissue engineering and regenerative medicine 2015: a year in review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 22(2), 101-113.

90. Wong, Maelene L., and Leigh G. Griffiths. 2014. 'Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization', *Acta biomaterialia*, 10: 1806-16.

91. Yang, X., Yu, X., Yagoub, A. G., Chen, L., Wahia, H., Osa, R., & Zhou, C. (2021). Structure and stability of low molecular weight collagen peptide (prepared from white carp skin)-calcium complex. *LWT*, 136, 110335.

92. Yen, M. H., Y. H. Chen, Y. S. Liu, and O. K. Lee. 2020. 'Alteration of Young's modulus in mesenchymal stromal cells during osteogenesis measured by atomic force microscopy', *Biochem Biophys Res Commun*, 526: 827-32.

93. Yoshioka, S. A., & Goissis, G. (2008). Thermal and spectrophotometric studies of new crosslinking method for collagen matrix with glutaraldehyde acetals. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(3), 1215-1223.

94. You, L., X. Weikang, Y. Lifeng, L. Changyan, L. Yongliang, W. Xiaohui, and X. Bin. 2018. 'In vivo immunogenicity of bovine bone removed by a novel decellularization protocol based on supercritical carbon dioxide', *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46: 334-44.

95. Zhang, X., Chen, X., Hong, H., Hu, R., Liu, J., & Liu, C. (2022). Decellularized extracellular matrix scaffolds: recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioactive materials*, 10, 15-31.

96. Zhu, W., Y. Qiu, F. Sheng, X. Yuan, L. Xu, H. Bao, J. Dai, and Z. Zhu. 2017. 'An effective delivery vehicle of demineralized bone matrix incorporated with engineered collagen-binding human bone morphogenetic protein-2 to accelerate spinal fusion at low dose', *J Mater Sci Mater Med*, 29: 2.