

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**BIOCOMPATIBILIDAD DE HIDROGEL DE MATRIZ DE VEJIGA
PORCINA EN CÉLULAS MESENQUIMALES Y MACRÓFAGOS**

NO. DE REGISTRO 2022-2

TESIS QUE PRESENTA:

CD. EMIGDIO DE JESÚS RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

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

DIRECTORES DE TESIS:

M.C. ALFREDO DEL ROSARIO AYALA HAM

DR. JOSÉ GEOVANNI ROMERO QUINTANA

CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO, ENERO 2022.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

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

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

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



FINANCIAMIENTO

Beca 747033 para estudios de posgrados CONACYT.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres **Javier Ramón Rodríguez Hernández** y **Ma. Del Roció Hernández Hernández** por apoyarme en todo momento en la decisión de estudiar en un posgrado. Por brindarme su apoyo incondicional, moral y económico para poder cumplir mi sueño profesional. Por estar para mí cada que lo necesitaba, ser un ejemplo de superación profesional y personal.

A mi hijo **Emilio Rafael Rodríguez Leo** quien es mi motivación y la razón de seguir adelante en los momentos más difíciles, que aun siendo pequeño y no comprender del todo las cosas, siempre me contagio su felicidad y me dio su amor.

A mi Abuela **Isabel Hernández Atilano** quien con sus consejos y su motivación me ha impulsado siempre a seguir por el buen camino, quien a pesar de la distancia esta siempre pendiente de lo que hago y de mi bienestar.

A mi hermano **Javier Ramón Rodríguez Hernández** quien fue mi primer paciente y confió en mí cuando decidí comenzar en la odontología.

A mi novia **Ángeles Monserrat García Gloria** quien es parte importante de mi vida, por estar conmigo en todo momento, escucharme y motivarme en momentos de estrés y desespero, por impulsarme a seguir siempre adelante y confiar en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis maestros de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nayarit, por brindarme los conocimientos necesarios para poder ser aceptado en el posgrado en Endodoncia de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Por apoyarme y motivarme a seguir siempre superándome y creciendo profesionalmente.

A todos mis maestros del Posgrado en Endodoncia de la UAS por compartir sus conocimientos y que a pesar de lo difícil que fue debido a la pandemia del SARS-CoV2, siempre estuvieron apoyándome, que me impulsaron a que este proyecto fuera realizado.

A mi asesor de tesis **Dr. Alfredo del Rosario Ayala Ham**. Por ser la persona de la cual aprendí la mayoría de las cosas, por siempre estar apoyándome, resolviendo mis dudas, al **Dr. German Jiménez Gastélum** por su apoyo durante todo el estudio en el laboratorio y a todas las personas que formaron parte de esta investigación que de forma directa o indirecta contribuyeron para que esta se llevara a cabo.

Quiero agradecer a **mis endo-hermanos del posgrado** por aceptarme siendo foráneo y demostrándome la calidez de los sinaloenses, por ser parte de mi vida en estos dos años, por su compañía, apoyo, amistad.

RESUMEN

Introducción. Los recientes avances en biotecnología, el estudio de los distintos biomateriales ha desarrollado un área que se define como ingeniería tisular entendiéndose por tal a la reconstrucción de nuevos tejidos para el reemplazo y la regeneración de estructuras destruidas y perdidas. Las matrices extracelulares descelularizadas (MEC) han sido usadas ampliamente en la ingeniería de tejidos, pueden derivar de diferentes tejidos entre los que destacan la vejiga porcina. Independientemente de la aplicación clínica del hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina (MHV), este debe ser extraída acelular y estéril, y ser biocompatible para poder ser utilizado como material de regeneración tisular. **Objetivo.** Evaluar biocompatibilidad de un hidrogel a base de matriz extracelular de vejiga porcina en macrófagos y células mesenquimales.

Materiales y Métodos. Se utilizaron cultivos de AD-MSC y Mø Murinos Raw 256.7 de referencia ATCC, cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia estas se desprendieron de la caja de cultivo mediante un método químico enzimático compuesto de tripsina-EDTA (0.25 %) para la realización de las diferentes pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*” (LDH y MTT) siguiendo las instrucciones del fabricante

Resultados. En la prueba LDH sobre Mø y AD-MSCs en contacto con el grupo experimental se registró muerte basal similar al DMEM, observando que no existió daño en la membrana celular, en la prueba MTT se observó actividad metabólica mayor al grupo control en todos los tiempos para ambos linajes celulares.

Conclusiones. Los bioandamios a base de MEC de MHV son biocompatibles en las pruebas *in vitro*, lo que los hace aptos para ser utilizados en futuros estudios *in vivo* en la regeneración de tejidos.

Palabras claves: hidrogel, Vejiga porcina, biocompatibilidad, matriz extracelular.

ABSTRACT

Introduction. Recent advances in biotechnology, knowledge of growth factors and the study of different biomaterials have developed an area that is defined as tissue engineering, understood as the reconstruction of new tissues for the replacement and regeneration of destroyed and lost structures. Decellularized extracellular matrices have been widely used in tissue engineering, they can be derived from different tissues, among which the porcine bladder stands out. Regardless of the clinical application of the porcine bladder extracellular matrix hydrogel, it must be made acellular and sterile. , display acceptable rates of biocompatibility to be used as tissue regeneration material. Objective: To evaluate the biocompatibility of a hydrogel based on porcine bladder extracellular matrix in macrophages and mesenchymal cells.

Materials and Methods. AD-MSK and Mø Murine Raw 256.7 ATCC reference cultures were used. When the cells reached 80% confluency, they were detached from the culture dish using an enzymatic chemical method consisting of trypsin-EDTA (0.25%) to carry out the different "in vitro" biocompatibility tests (LDH and MTT) following the manufacturer's instructions. **Results.** In the LDH test on Mø and AD-MSKs in contact with the experimental group, a death baseline similar to DMEM was recorded, observing that there was no damage to the cell membrane, in the MTT test, a higher metabolic activity was observed than the control group at all times for both cell lineages. **Conclusions.** MHV MEC-based bioscaffolds are biocompatible on *in vitro* tests, which makes them suitable for use on *-in vivo* studies.

Keywords: hydrogel, Porcine bladder, biocompatibility, extracellular matrix

ÍNDICE

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS.....	xii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 DEFECTOS TISULARES EN EL ÁREA ODONTOLÓGICA.	4
1.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS	5
1.2.1 CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (MSC)	5
1.2.2 MACRÓFAGOS.....	6
1.2.3 BIOCOMPATIBILIDAD	7
1.2.3.1 ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	8
1.3 BIOMATERIALES	9
1.3.1 MATERIALES BIOLÓGICOS DE RELLENO	10
1.3.2 INJERTOS.....	10
1.3.3 MATRIZ EXTRACELULAR.....	11
1.3.4 HIDROGELES	12
2 ANTECEDENTES	18
3 JUSTIFICACIÓN	20
4 HIPOTESIS.....	21
5 OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GENERAL	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
6 MATERIALES Y MÉTODOS	23

6.1	LUGAR DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	23
6.2	TIPO DE ESTUDIO.....	23
6.3	MUESTRA	23
7	METODOLOGÍA	24
7.1.1	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS AD-MSCS Y MO MURINOS RAW 256.7	24
7.1.2	PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS.....	24
7.1.3	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR.	25
7.1.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
7.2	LUGAR DE REALIZACIÓN.....	26
8	RESULTADOS.....	27
8.1	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE CITOTOXICIDAD (LDH)	27
8.2	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ACTIVIDAD METABÓLICA (MTT)	30
8.3	EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA CELULAR	33
8.3.1	MACRÓFAGOS.....	33
8.3.2	CÉLULAS MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO.	35
9	DISCUSIÓN	37
10	CONCLUSIONES.....	39
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
12	ANEXOS.....	44
12.1	PROCEDIMIENTO ENSAYO MTT.....	44
12.2	PROCEDIMIENTO LDH.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de hidrogeles representativos para el cultivo celular y sus características.	13
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de los cultivos celulares 2D (A) y 3D (B)	16
Figura 2. Absorbancias de los ensayos de LDH con Mø.....	28
Figura 3. Absorbancias de los ensayos de LDH con AD-MSCs.....	29
Figura 4. Absorbancias de los ensayos de MTT con Mø *P<0.05.....	31
Figura 5. Absorbancias de los hidrogeles de MTT con AD-MSCs a 24, 48 y 72 H. *P<0.05	32
Figura 6. Microfotografía a 40X de Macrófagos ensayo MTT a 24,48 y 72 H	34
Figura 7. Microfotografía a 40X de Células Mesenquimales de tejido adiposo en ensayo MTT a 24,48 y 72 H.	36

ABREVIATURAS

MEC: Matriz extracelular.

MHV: Hidrogel de Matriz de Vejiga.

MSCs: Células troncales mesenquimales.

MSCs-Ad: Células mesenquimales de tejido adiposo.

Mo: Macrófagos.

ESCs: Células troncales embriónicas.

MHC: Complejo principal de Histocompatibilidad.

IFN- γ : Interferón Gama.

PSM: Células de músculo liso porcino.

SIS: Submucosa intestinal.

ADM: Matriz dérmica acelular.

CEM: Matriz derivada de colecisto.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

DMEM: Dulbecco modified Eagles minimal essential medium.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

ATCC: American type culture collection.

CO₂: Dióxido de carbono.

RPM: Revoluciones por minuto.

DS: Desviación estándar.

ANOVA: Análisis de varianza.

H: Horas.

mL: Mililitro.

1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años en medicina, incluyendo la odontología, se han estudiado los procesos de regeneración biológica de estructuras que han sido perdidas o dañadas por diversos factores, tales como traumas, infecciones, anomalías congénitas, enfermedades neoplásicas, entre otras.

Los avances en la regeneración de los tejidos dañados se basan en la contribución de ciencias como la biología molecular, biología celular, biología del desarrollo, nanotecnología, el estudio del genoma humano, el desarrollo de materiales nuevos. Estas ciencias se han conjuntado en una disciplina denominada Ingeniería de tejidos. La investigación en ingeniería tisular comenzó aproximadamente en 1987 y ha tenido un avance espectacular y su utilidad en el campo médico empieza a ser cada vez mayor.

La ingeniería tisular se basa principalmente en tres componentes fundamentales: 1) Células, 2) Andamios y 3) Biomoléculas (factores de crecimiento).

Actualmente en la ingeniería tisular existen diversas alternativas de regeneración que pueden ser utilizadas y ofrecen resultados muy favorables. Las matrices extracelulares descelularizadas han sido usadas ampliamente en la ingeniería de tejidos y se han vuelto muy versátiles ya que pueden ser empleadas en parches, polvos e hidrogeles. Estos últimos pueden ser inyectados, lo que provee una forma mínimamente invasiva de tratamiento (2).

Los hidrogeles son un tipo de bioandamio ampliamente utilizado para distintas aplicaciones biomédicas, ya que presentan unas características únicas (3).

Son ampliamente biocompatibles, debido a que son capaces de absorber grandes cantidades de agua y proporcionan un microambiente acuoso que es similar al de la matriz extracelular, del mismo modo promueven el crecimiento celular. Son estructuras porosas permeables que permiten el paso de nutrientes y solutos de bajo peso molecular, necesarios para la supervivencia y el crecimiento de las células. Estos deben ser biodegradables y fáciles de eliminar así mismo promover la formación de nuevo tejido sano (3).

Los hidrogeles pueden derivar de diferentes tejidos entre los que destacan la vejiga porcina y el hueso bovino y pueden ser biofuncionalizados, de modo que pueden contener factores de crecimiento e incluso puede fucionalizarse con células (3,6). Los hidrogeles de matriz extracelular de vejiga porcina (MHV), se han utilizado con éxito para la reconstrucción de una gran variedad de tejidos, dentro de los que se incluyen el tracto urinario inferior, estructuras músculo tendinosas, piel, así como el esófago, entre otras.

Independientemente de la aplicación clínica del hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina, este debe ser hecho de manera acelular y estéril, mostrar tasas aceptables de biocompatibilidad para poder ser utilizado como material de regeneración tisular. (5)

Estudios realizados en el laboratorio de microbiología molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa sobre un hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina, buscan destacar sus tasas de biocompatibilidad, con la finalidad de ser utilizado como un material capaz de regenerar diferentes estructuras de la cavidad oral.

1.1 DEFECTOS TISULARES EN EL ÁREA ODONTOLÓGICA.

La cavidad oral puede ser invadida por una enorme cantidad de microorganismos que causan la necrosis del tejido pulpar, así como lesiones periapicales y periodontales que ponen en riesgo la salud y permanencia del órgano dental en cavidad oral(6).

Por ello, la Odontología tiene como uno de sus objetivos eliminar la mayor cantidad de microorganismos presentes en las diferentes patologías que se pudieran presentar. Sin embargo, en ocasiones estos procedimientos no los eliminan de manera efectiva todos los microorganismos presentes pudiendo ocurrir diferentes factores que recaigan en el fracaso del tratamiento produciendo una lesión crónica que llega a causar la reabsorción de los tejidos (7).

En los diferentes procedimientos que se realizan para eliminar las patologías presentes en la cavidad oral, se llega a producir un gran defecto y puede ser necesario utilizar materiales biológicos para el relleno de la cavidad que favorezcan una rápida cicatrización, así como reparación (8).

Una vez que se genera un gran defecto tisular es importante conocer los procedimientos que favorezcan la formación de nuevo tejido, para esto existe un área denominada Ingeniería de tejidos la cual debemos estudiar y comprender en busca del éxito en nuestros tratamientos.

1.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS

Los recientes avances en biotecnología, el conocimiento de los factores de crecimiento y el estudio de los distintos biomateriales han permitido el desarrollo de un área que se define como ingeniería tisular entendiendo por tal a la reconstrucción de nuevos tejidos para el reemplazo y la regeneración de estructuras destruidas y perdidas (9).

En algunos tejidos, como la piel y la sangre, el proceso de regeneración es muy rápido y se lleva a cabo diariamente; mientras que, en otros, este proceso es muy lento, como sucede con las neuronas del cerebro, hueso y cartílago entre otras. Las células encargadas de llevar a cabo los procesos anteriormente descritos son las células troncales, es por ello que estas células ocupan un papel trascendente en la ingeniería de tejidos y se requiere que las conozcamos a profundidad (10).

1.2.1 CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (MSC)

Las células troncales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés “Mesenchymal Stem Cells”), se consideran células troncales somáticas que se pueden encontrar en distintos tejidos de un organismo adulto y también en fuentes neonatales. Estas células, originalmente se identificaron en la médula ósea y poseen un amplio potencial de diferenciación, capacidad de soporte hematopoyético y capacidad inmunoreguladora. Haga clic o pulse aquí para escribir texto.. Son células con capacidad de autorrenovación, no diferenciadas y son capaces de generar células que pueden diferenciarse al menos a un linaje particular. Debido a estas propiedades, existe gran expectativa, sobre su uso futuro en protocolos de terapia de regeneración de tejidos (11).

Las alternativas de células troncales disponibles son: células troncales embrionarias (“Embryonic Stem Cells”, ESCs) y células troncales adultas. Aunque el potencial

terapéutico de las ESCs parece enorme debido a su gran capacidad de renovación y pluripotencialidad, hay limitaciones prácticas y éticas en su utilización. A diferencia del tipo adulto que es posible de obtener de varios tejidos ya desarrollados no posee tales limitaciones, a este tipo se les denomina células troncales mesenquimales (“Mesenchymal Stem Cells”, MSCs) (12).

Actualmente es posible obtener células troncales somáticas de varios tejidos y órganos, como la medula ósea, adipocitos, pulpa dental, cordón umbilical y placenta, por mencionar algunos.

1.2.2 MACRÓFAGOS

Los macrófagos, clasificados como fagocitos mononucleares debido a su elevada capacidad de fagocitar y la presencia de un núcleo en su citoplasma, derivan de monocitos que han dejado el torrente sanguíneo y han entrado en los diferentes tejidos y se han diferenciado. Una subpoblación importante de macrófagos desempeña funciones activas de endocitosis y fagocitosis. Debido a su movilidad y actividad fagocítica, estos elementos celulares son capaces de actuar como basureros “scavengers”, que eliminan hematíes extravasados, células muertas y sustancias extrañas presentes en los tejidos. El material ingerido por los macrófagos es destruido mediante la acción de enzimas lisosomales(13).

De igual manera los macrófagos participan en reacciones inmunológicas mediante el procesamiento del antígeno y su presentación posterior a los linfocitos T efectores. El antígeno procesado se une a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés Major Histocompatibility Complex) clase II, lo que hace posible que se establezca una interacción con receptores específicos presentes en los linfocitos T efectores(13).

Como respuesta el linfocito T libera citocinas como el IFN- γ), el cual es muy importante para incrementar las capacidades microbidas del macrófago (14). Una vez activados por estímulos inflamatorios apropiados, los macrófagos son capaces de producir una gran variedad de factores solubles, entre ellos interleucina 1, factor de necrosis tumoral, factores de crecimiento y otras citocinas(13).

Es por esto que los macrófagos son células fundamentales en el sistema inmunológico y resulta ser muy importante la interacción que éstos puedan llegar a tener con cualquier material a utilizar en las terapias de regeneración de tejidos.

1.2.3 BIOCOMPATIBILIDAD

Es la característica esencial que deben poseer los biomateriales para ser empleados en el campo de biomedicina, para que un biomaterial se considere biocompatible, el organismo no debe desencadenar una respuesta inmunológica contra el material, aceptándolo como propio y restableciendo la función previamente perdida(15).

La biocompatibilidad de un material puede ser evaluada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, estas pruebas miden las consecuencias inducidas por las sustancias secretadas por los biomateriales. Uno de los pasos recomendados para la evaluación biológica de nuevos biomateriales es evaluar la citotoxicidad y la actividad metabólica de células *in vitro*. Es importante que no se presenten efectos tóxicos para el cuerpo y de esta forma evaluar las respuestas biológicas que podrían causar daños o efectos secundarios no deseados al hospedero.

1.2.3.1 ENSAYOS DE BIOCAMPATIBILIDAD

Las pruebas *in vitro* de biocompatibilidad son muy útiles para caracterizar los efectos tóxicos ocultos de los biomateriales, relacionados con su composición química, peso molecular, polidispersidad, velocidad de degradación, entre otros.

Los ensayos de citotoxicidad buscan medir los efectos en las células en las primeras 12 a 24 horas después de la exposición a sustancias tóxicas, sin embargo, algunas células pueden recuperarse del daño químico, esto muchas veces no concuerda con las reacciones *in vivo*, es por eso que es preferible realizar pruebas de toxicidad *in vitro* ya que los resultados pueden ser más reproducibles (16).

Es necesario determinar la biocompatibilidad de cualquier biomaterial para evaluar su fiabilidad clínica. Por lo tanto, continuamente se realizan pruebas preliminares *in vitro* para detectar y caracterizar los efectos potencialmente dañinos de un material antes de ser utilizado en humanos (16).

Existen técnicas de contacto indirecto utilizadas para evaluar biocompatibilidad, las técnicas de prueba indirecta son importantes para la detección de sustancias que podrían ejercer efectos tóxicos sobre las células (15).

La prueba de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) es utilizada muy a menudo como una medida de viabilidad celular, debido a que un daño a la membrana de las células da como resultado la liberación de la enzima.

Los métodos basados en formazán suelen ser los más usados para evaluar la viabilidad y crecimiento de células, e incluyen ensayos colorimétricos MTT, MTS, XTT, INT y WST-1 que miden la actividad mitocondrial en células viables (17).

1.3 BIOMATERIALES

Un biomaterial en la ingeniería de tejidos debe cumplir con los criterios generales de diseño para el desarrollo de la mayoría de los andamios biocompatibles; debe ser biocompatible, no citotóxico y no inmunogénico para evitar cualquier efecto adverso sobre las células residuales y reclutadas así como en el tejido vecino, la química de los materiales debe adaptarse para apoyar la adhesión y proliferación celular (3).

El reto particular en el diseño de andamios incluye el mantenimiento de la estabilidad mecánica adecuada que debería ser igual a la del tejido circundante cuando se coloca, mientras que posee una alta cantidad de poros para permitir el posicionamiento de las células y el crecimiento interno (18). Además, el biomaterial debe degradarse a un ritmo que minimice la interferencia con el desarrollo normal del tejido y los eventos de curación, mientras mantiene la integridad mecánica durante períodos de tiempo que varían de pocas semanas a varios meses (19), todas estas características son necesarias en el análisis y elección de los materiales a utilizar.

Los biomateriales más utilizados en la terapia de regeneración tisular se describen los de injerto o relleno, los cuales son productos biológicos que rellenan los defectos tisulares. También se cuenta con materiales de aislamiento o barrera que son biomateriales naturales o sintéticos que actúan evitando que ciertos tipos celulares invadan un espacio concreto permitiendo así la proliferación de grupos celulares específicos (20).

1.3.1 MATERIALES BIOLÓGICOS DE RELLENO

1.3.2 INJERTOS

El injerto de tejido ideal debería tener las propiedades de ser biocompatible y proporcionar estabilidad biomecánica (21).

Entre las diferentes opciones se enlistan las siguientes:

- Injertos autólogos o autógenos: Tejido obtenido del propio paciente (21).
- Injertos homólogos, alogénicos o aloinjertos: Proceden de individuos de la misma especie; pero genéticamente diferentes (22).
- Injertos heterólogos o xenoinjertos: De origen natural, provienen de otra especie (animales) (23).
- Injertos aloplásticos o sintéticos: Provenientes de materiales fabricados sintéticamente (22).

El trasplante autólogo se considera el procedimiento estándar de oro debido a su inmunocompatibilidad, aunque persisten varias limitaciones, como el requisito de una cirugía secundaria, la posible morbilidad y la cantidad limitada de tejido donante (21).

El aloinjerto o xenoinjerto, el trasplante del tejido obtenido de donantes humanos u otras especies, respectivamente, son tratamientos opcionales, pero cada proceso tiene los problemas inherentes a la posible transmisión de patógenos de donantes, respuestas inmunogénicas y altos riesgos de infección (22).

El costo de injertos es relativamente alto y puede no estar al alcance de todos los pacientes por lo que actualmente se investigan nuevos biomateriales que permitan manejar costos más accesibles y resultados regenerativos excelentes (24). Además, los nuevos biomateriales podrían cumplir los enfoques de ingeniería de tejidos que surgieron como un posible proceso terapéutico alternativo para tratar a pacientes con técnicas mínimamente invasivas (4).

1.3.3 MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular es el componente no celular del tejido que proporciona el soporte estructural y las señales bioquímicas para determinar el destino de una célula. La matriz extracelular (MEC) es un material natural que abarca tanto el microambiente celular y factores bioquímicos para las células. Cada tipo de tejido tiene una estructura y composición de MEC especializada que modula las respuestas celulares y beneficia la supervivencia de las células dentro de ese tejido (26).

La MEC está compuesto por dos componentes principales, colágeno y proteoglicanos, que son secretados por células y ensamblados de una manera específica para los tipos de tejidos individuales. Contiene un reservorio de factores de crecimiento y citocinas; estos envían señales que regulan la proliferación y migración celular, así como modulan la diferenciación y la expresión fenotípica de la célula. Debido a su similitud compositiva inherente y sus capacidades moduladoras para apoyar el crecimiento y la diferenciación de tejidos, el uso de MEC específicos de tejidos para la regeneración de tejidos ha ganado popularidad, incluso en las áreas de ingeniería de huesos y cartílagos (25).

Para aprovechar los efectos influyentes de las señales de MEC en el comportamiento de las células madre (MSC), los biomateriales están diseñados para recrear aspectos clave de los entornos de MEC.

Con el fin de desarrollar un entorno similar a MEC se ha desarrollado una gama de sistemas biomateriales para este objetivo, incluidos sustratos de vidrio estampados, películas elastoméricas, cerámica de hidroxiapatita y espumas fibrilares. Sin embargo, los hidrogeles (redes de polímeros hinchados por el agua) se han convertido en la opción más prometedora para el cultivo celular (26).

1.3.4 HIDROGELES

El término hidrogel se utiliza para denominar a un tipo de material de base polimérica caracterizado por su extraordinaria capacidad para absorber agua y diferentes fluidos. La hidrofilia de estos geles es debido a grupos como: -OH, -COOH, -CONH₂, y -SO₃H. Esta propiedad de absorber agua les convierte en materiales de enorme interés, sobre todo en la medicina como sistemas de liberación controlada y/o sostenida de principios activos, dispositivos para diagnóstico, sustrato para el cultivo de células, geles para electroforesis, desintoxicantes sanguíneos, membranas para hemodiálisis, sistemas terapéuticos biodegradables, lentes de contacto e implantes. Estos hidrogeles se obtienen mediante polimerización y entrecruzamiento simultáneo de uno o varios monómeros mono o polifuncionales (27).

Se deben conocer los diferentes tipos de hidrogeles que existen a nuestro alcance o que se pueden fabricar para tener la capacidad de elegir el adecuado para el estudio a realizar, en la revisión realizada es posible encontrar la clasificación de los más representativos para el cultivo celular con algunas de sus características (28).

Tabla 1 Clasificación de hidrogeles representativos para el cultivo celular y sus características.

Material	Proveedores de ejemplo	Características materiales notable
1. MATERIALES NATURALES		
Colágeno	BD BioSciences, Advanced BioMatrix (PureCol, FibriCol), Vitrogen, Flexcell (Thermacol, Collagel)	-Se obtiene del tendón de la cola de rata o de la piel y el tendón de los bovinos. -Se adquiere en forma de pepsina o solubilizada en ácido y se almacena a pH y temperatura bajos. -Enzimáticamente degradable. -Presenta propiedades estructurales y mecánicas que recuerdan a los tejidos nativos. Presenta ligandos de adhesión celular nativa.
Fibrina	Baxter (Tisseel, Artiss), Johnson & Johnson (Evicel), Sigma	-Típicamente procedente de plasma humano -Enzimáticamente degradable -Proporciona un buen sustrato para estudiar los fenómenos de curación de heridas. <i>in vitro</i> Utilidad de límite de mecánica baja
Alginato	NovaMatrix-3D, PRONOVA (FMC BioPolymer)	-Derivado de algas pardas -Debe modificarse con ligandos adhesivos para la unión celular. -La reticulación iónica con cationes divalentes permite una fácil encapsulación y recuperación celular. La reticulación covalente adicional a menudo es necesaria para la resistencia.
2. MATERIALES SINTÉTICOS		
Poliacrilamida (PA)	Sigma	-Amplia gama de ajuste de la mecánica del sustrato. - Probablemente el material más estandarizado en cuanto a protocolos para hacer hidrogeles y usar para cultivo -Adecuado solo para cultivo celular 2D
Polietilenglicol (PEG)	QGel Inc. (QGel), Sigma, Cellendes (3-D Life Dextran-PEG o PVAPEG), BioTime Inc. (PEGgel)	-El material sintético 'pizarra en blanco' permite una gran cantidad de modificaciones para el usuario. -Versiones premodificadas y diversos pesos moleculares están fácilmente disponibles. -Puede ser diseñado para presentar diferentes ligandos adhesivos y degradarse a través de modos pasivos, proteolíticos o dirigidos por el usuario.
3. MATERIALES HÍBRIDOS		
Ácido hialurónico (HA)	Lifecore (Corgel BioHydrogel), BioTime Inc.	-Se produce a través de la fermentación bacteriana, pero también puede obtenerse de productos animales.

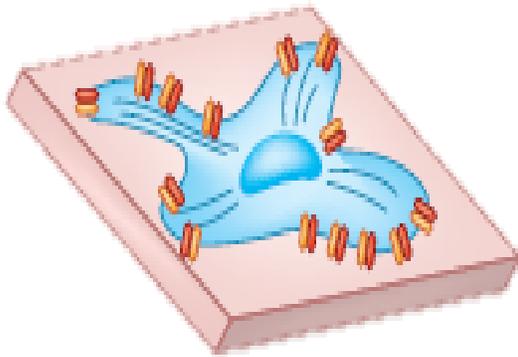
	(HyStem), BRTI Life Sciences (Cell-Mate3D)	-La gran variedad y el alto grado de modificación química potencial permite una considerable capacidad de sintonización. Interactúa con los receptores celulares, pero debe modificarse con ligandos adhesivos para permitir la unión celular.
Polipéptidos	Corning (PuraMatrix), PepGel LLC (PGmatrix), Sigma (HydroMatrix)	-Típicamente formado por autoensamblaje -Útil en aplicaciones de tejidos blandos y en combinación con otros materiales -La ingeniería de proteínas permite una gran flexibilidad de diseño

(29)

Se deben considerar muchos factores al seleccionar un hidrogel; Lo más importante para el biólogo típico es la adhesividad a las células, la estabilidad en el cultivo y las propiedades biofísicas como el módulo elástico de hidrogel (29).

Además de la selección de hidrogel, es importante identificar si es más apropiado cultivar células en 2D (encima de una película de hidrogel) o en 3D (encapsulado dentro de un hidrogel). En general, las celdas están menos restringidas en 2D que en entornos de hidrogel 3D. El cultivo de células en películas de hidrogel 2D tiene algunas de las mismas desventajas que los métodos convencionales, pero permite el control definido por el usuario de la rigidez del sustrato y la presentación del ligando adhesivo (26).

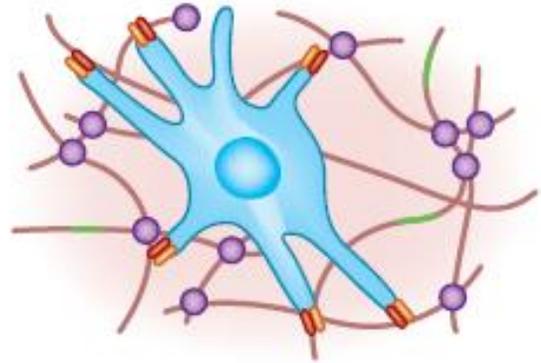
Los hidrogeles 3D pueden modelar con mayor precisión la arquitectura de algunos tejidos y presentar medios que conducen a respuestas celulares más realistas, especialmente en el contexto de entornos fisiopatológicos (Figura 1) (30).



A)

Características:

- Forma de células aplanadas.
- Distribución anormal de complejos de ligando de adhesión integrina.
- Rigidez superfisiológica
- Polaridad forzada



B)

Características:

- Ligandos de adhesión: péptidos (RGD), proteínas (colágeno, fibronectina, laminina).
- Modos de degradación
- Presentan a las células un microambiente más realista.

Figura 1. Características de los cultivos celulares 2D (A) y 3D (B)

Características que poseen las células al posicionarse sobre los diferentes tipos de hidrogeles.

Los hidrogeles son biomateriales que pueden exponer a las células madre a una variedad de entornos, y son biomateriales adecuados para investigar los efectos de múltiples componentes de MEC en la formación de tejido óseo y cartilaginoso dado que imitan elementos sobresalientes de las matrices extracelulares nativas (MEC), tienen una mecánica similar a la de muchos tejidos blandos y pueden soportar la adhesión celular y el secuestro de proteínas (26).

Los hidrogeles pueden derivar de diferentes tejidos entre los que destacan la vejiga porcina y el hueso bovino y pueden ser biofuncionalizados, de modo que pueden contener factores de crecimiento e incluso puede fucionalizarse con células (25).

Sin duda alguna los hidrogeles son una excelente opción para el cultivo celular, podrían ser el biomaterial más viable para regeneración de tejidos por sus múltiples características benéficas.

Aunque hace varios años que se investigan, definitivamente hay mucho más por estudiar.

2 ANTECEDENTES

Los biomateriales han sido estudiados desde el siglo XIX, viendo como las células interactúan y se unen a los materiales, estos biomateriales tienen influencia en la expresión génica, el destino celular, la migración, el anclaje, la proliferación, la diferenciación y la activación celular. Los biomateriales son “interrogados” por células del sistema inmunológico como son neutrófilos y macrófagos poco después de su implantación es por eso que se debe observar el impacto que estos biomateriales tendrán al contacto con las células de manera *in vitro*, para así determinar su uso de manera *in vivo* (32).

La matriz extracelular (MEC) ha sido utilizada en la ingeniería de tejidos por años, derivándose ésta de numerosas fuentes de tejidos y en diferentes presentaciones.

Los hidrogeles de MEC han sido utilizados en tratamiento de enfermedades, como lesiones isquémicas, regeneración o remplazo de órganos y estructuras, pero para la utilización de estos hidrogeles es importante una investigación de biocompatibilidad *in vitro* antes de ser utilizadas de manera *in vivo*. La (MHV) es un bioandamio que ha sido utilizado en la reconstrucción de la vejiga humana, el tracto urinario inferior, así como estructuras musculo tendinosas, esófago, etc.

Estudios de biocompatibilidad en MHV para reconstrucción de tejidos, señalan no inducir rechazo inmunológico, así como proporcionar un buen soporte para su utilización en regeneración (32).

Brown et al. (33).; realizaron un estudio *in vivo* comparando MEC de vejiga urinaria, intestino e hígado sobre el crecimiento de varias líneas células, los resultados mostraron que el sistema inmunitario del hospedero recibe señales adaptativas de MEC de vejiga que proporcionaba patrones de crecimiento celular, apoyando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y facilitando la proliferación de células.

Bolland et al. (34).; Realizaron un estudio en donde se produjo una MEC de vejiga porcina, se descelularizaron vejigas de espesor total y se realizaron análisis histológicos, así como biocompatibilidad MTT con medios condicionados y células de músculo liso porcino, mostrando que las células PSM, pudieron crecer tanto en el control como en el medio condicionado, proporcionando evidencia que la matriz descelularizada no era citotóxica. Lo que sugiera que la matriz extracelular de vejiga porcina tiene potencial para su uso en urología y aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Liu et at. (35).; Realizaron un estudio en el que se propuso modificar un material quirúrgico vaginal de polipropileno funcionalizandolo con MHV para mejorar la biocompatibilidad, éste se evaluó en 48 ratas, las cuales se sometieron a cirugía vaginal con la implantación de diferentes materiales MHV (U), MHV+ Polipropileno (UP) y polipropileno (P), a 7, 14, 21 y 28 días, la reacción de inflamación fue mayor en el grupo (P), pero fue menor en los Grupos (U) y (UP), así como lo indican la presencia reducida de células CD4 y CD8, concluyendo que la (MHV) , permitía el aislamiento mecánico de polipropileno y reducía su respuesta inmunológica, sugiriendo que la MHV+polipropileno como un andamio en la ingeniería de tejidos puede ser un material prometedor para el uso clínico en cirugía de reconstrucción pélvica.

Liu et at. (36).; Compararon las propiedades biológicas de la MEC derivada de diferentes fuentes de tejido de cerdos Bama miniatura, se realizaron ensayos histológicos, capacidad de absorción de agua, capacidad de biodegradación, propiedades mecánicas, actividad antimicrobiana y biocompatibilidad *in vitro*.

Las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* se realizaron mediante el ensayo de MTT, este lo realizaron con medios condicionados de MEC de submucosa intestinal (SIS), MEC de vejiga urinaria (MHV), MEC dérmica acelular (ADM), MEC derivada de colecisto (CEM), MEC de pericardio acelular. La evaluación se realizó a los 2, 4, 6, y 8 días, dando como resultado que la (MHV) presentaba la mejor biocompatibilidad *in vitro* en comparación a las demás MEC (36).

3 JUSTIFICACIÓN

La pérdida de tejidos afectados por las diferentes lesiones traumáticas, infecciosas o patologías en la cavidad oral ha llevado a un gran avance en el campo de la ingeniería tisular, esto buscando restaurar el tejido perdido por las enfermedades capaces de destruir los tejidos de la cavidad oral, se han buscado el uso de nuevos biomateriales como el uso de matriz extracelular de vejiga de porcina.

Para que estos biomateriales sean considerados en las terapias de regeneración de tejidos la característica más importante que deben poseer es la biocompatibilidad, ya que se busca sean aceptados por el organismo como propios, así mismo no generar una respuesta inmunológica. Es por eso que es importante investigar la biocompatibilidad de un biomaterial de manera *in vitro* sobre 2 células importantes como lo son las células troncales mesenquimales, cruciales en los procesos de regeneración y los macrófagos, una célula fundamental del sistema inmunológico.

El costo de injertos es relativamente alto y puede no estar al alcance de todos los pacientes por lo que actualmente se requiere indagar en nuevos materiales biocompatibles que permitan manejar costos más accesibles, resultados regenerativos excelentes y mínimamente invasivos.

Actualmente existen hidrogeles a partir de matriz extracelular de vejiga porcina que son una opción viable de regeneración, pero con pocos años de estudio, por ello creemos importante el realizar esta investigación.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una nueva MEC de vejiga porcina, sin embargo, para considerar su uso en pacientes es necesario evaluar primeramente su biocompatibilidad de manera *in vitro*.

4 HIPOTESIS

El hidrogel de Matriz Extracelular de Vejiga porcina es biocompatible con células mesenquimales y macrófagos.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar biocompatibilidad de un hidrogel a base de matriz extracelular de vejiga porcina en macrófagos y células mesenquimales.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar macrófagos y células mesenquimales para realizar los ensayos de biocompatibilidad.
- Realizar pruebas de citotoxicidad (LDH) y actividad metabólica (MTT) del hidrogel de vejiga porcina sobre las líneas celulares.
- Evaluar la muerte celular y proliferación de los grupos de estudio.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 LUGAR DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se obtuvieron del laboratorio de microbiología molecular de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

6.2 TIPO DE ESTUDIO

In vitro, experimental, transversal, prospectivo.

6.3 MUESTRA

Hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina.

7 METODOLOGÍA

7.1.1 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS AD-MSCS Y MO MURINOS RAW 256.7

Se utilizaron cultivos de AD-MSK y Mo Murinos Raw 256.7 de referencia ATCC, que se encontraban almacenadas en termos con nitrógeno líquido del laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma de Sinaloa (Culiacán, Sinaloa, México). Un criovial fue descongelado a 37 °C, utilizando un baño María. Para la expansión celular, las células se cultivaron con medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibiótico penicilina estreptomina a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ y 95 % de humedad, cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia estas se desprendieron de la caja de cultivo mediante un método químico enzimático compuesto de tripsina-EDTA (0.25 %) para la realización de las diferentes pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*”. Se llevo a cabo la determinación de la viabilidad y concentración celular a través de una tinción de exclusión de vitalidad con azul de tripano (0.4%) y con la cámara de Neubauer, respectivamente.

7.1.2 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS

Para las pruebas biocompatibilidad celular “*in vitro*” se prepararon medios condicionados de los hidrogeles de MEC. En un microtubo de 1.5 mL se colocaron perlas de vidrio de 0.05 mm hasta los 2 mL. Luego se colocó 1 mL de hidrogel a una concentración de 20 mg/ml agregando 9 ml de medio de cultivo DMEM suplementado (10% de suero bovino fetal y 1% de antibiótico penicilina-estreptomina). Los microtubos se llevaron al disruptor de tejidos durante 1 minuto a velocidad máxima y se incubaron a 37° C en agitación constante durante 24 horas. Finalmente, los medios de cultivo se centrifugaron a 13,000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes con una jeringa estéril para ser filtrados en una unidad de filtración con un tamaño de poro de 0.22 µm.

7.1.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR.

Para los ensayos de citotoxicidad celular (LDH) y proliferación celular (MTT), se emplearon cajas de cultivo de 96 pozos. Se sembraron 7,500 células/pozo para la prueba de MTT y 15,000 células/pozo para la prueba de LDH de cada una de las 2 líneas celulares. Previo a las pruebas se permitió la adherencia y establecimiento celular durante 24 horas con medio estándar. Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se colocaron 200 µl de los medios condicionados o medio DMEM como control. Tras el contacto a los extractos de las células, se llevaron a cabo los procedimientos para la evaluación.

Se empleo un método espectrofotométrico basado en la absorbancia derivada de la formación de un cromóforo a partir de la degradación enzimática de sales de tetrazolio con un lector de placas. Se empleo una longitud de onda de 570 nm para el Kit CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) y 490 nm para el Kit CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Cytotoxicity Assay (LDH) ambos de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los ensayos de proliferación los tiempos de evaluación fueron de 24, 48 y 72 h, mientras que para los ensayos de citotoxicidad se evaluó a las 24 h de exposición a los extractos.

7.1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados de las variables cuantitativas se representarán como promedio \pm su desviación estándar (DS). Los datos cualitativos se expresarán como porcentajes \pm su DS. Para todos los análisis se utilizó el programa IBM SPSS v20.0 (SPSS inc, IL, USA), los resultados se evaluarán mediante un análisis de varianzas (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95%.

7.2 LUGAR DE REALIZACIÓN

Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

8 RESULTADOS

8.1 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE CITOTOXICIDAD (LDH)

La determinación de citotoxicidad se realizó mediante la prueba de LDH, en este ensayo se llevó a cabo la medición de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa del citosol de las células que existe cuando estas son lisadas a las 24 H. Al finalizar la prueba LDH se observó un cambio colorimétrico cuyas diferencias se evaluaron a través del registro de las absorbancias.

A las 24 horas de exposición de los Mø a los extractos de MHV, mostró liberación de LDH similar a grupo control (DMEM), sin diferencias estadísticamente significativa, solamente al hacer el análisis de control de muerte máxima encontraron diferencias estadísticas (figura 2).

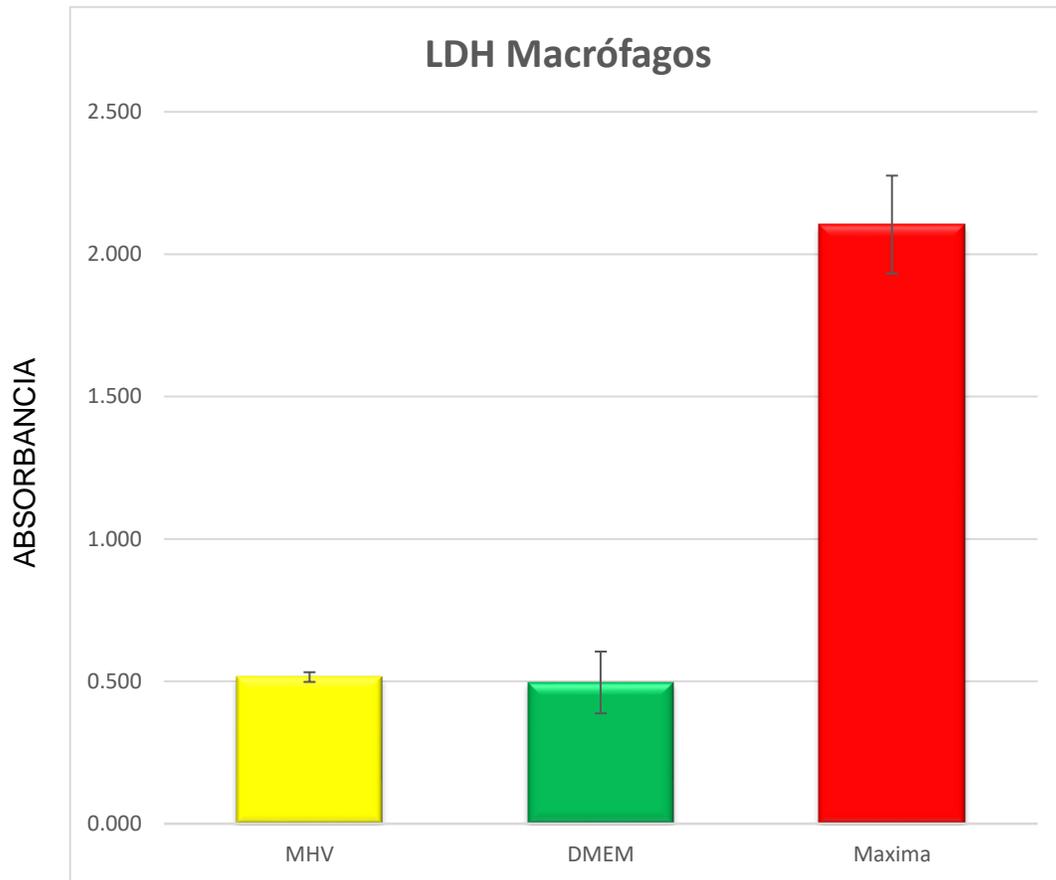


Figura 2. Absorbancias de los ensayos de LDH con Mø. Se observaron diferencias estadísticamente significativas del grupo de muerte máxima en comparación con los demás grupos. *P<0.05

En la prueba LDH sobre AD-MSCs en contacto con el grupo experimental se registró muerte basal similar al DMEM (Figura 3), observando que no existió daño en la membrana celular, en comparación con el grupo de muerte máxima donde existió diferencia significativa.

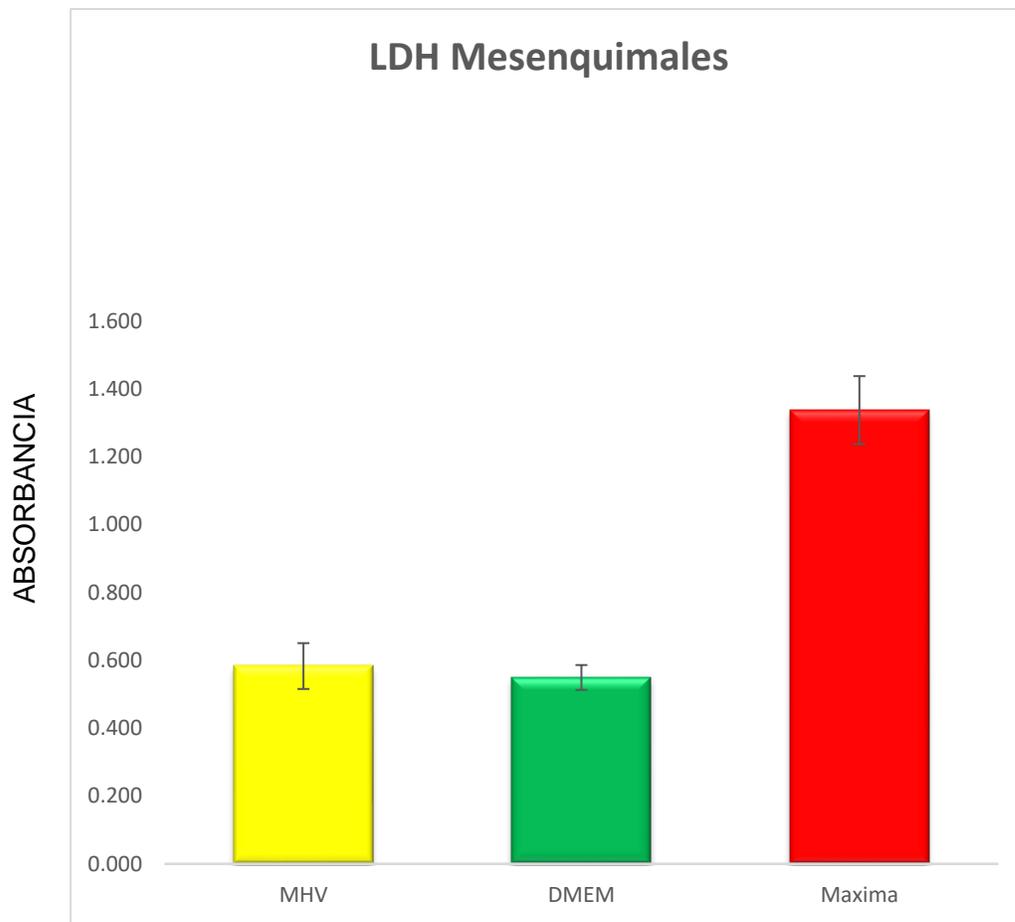


Figura 3. Absorbancias de los ensayos de LDH con AD-MSCs Diferencias estadísticamente significativas del grupo de muerte máxima en comparación con los demás grupos. *P<0.05.

Esto nos señala que los hidrogeles de MHV no tienen efecto citotóxico sobre las 2 líneas celulares. Se registró una muerte basal normal con el hidrogel de vejiga en comparación con DMEM tras la exposición de AD-MSCs y Mø.

8.2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ACTIVIDAD METABÓLICA (MTT)

Se evaluaron los efectos de los hidrogeles de MEC sobre dos líneas celulares con prueba MTT a 24, 48 y 72 h. Las células se observaron en un microscopio con contraste de fases con un objetivo de 40X observando producción de formazan.

A las 24 y 48 h los Mø Raw/264.7 en contacto con los extractos de MHV, presentaron mayores tasas de actividad metabólica comparado con el grupo DMEM. Sin embargo, a las 72 h los Mø Raw/264.7 del grupo DMEM aumentaron exponencialmente su tasa de actividad metabólica por encima del grupo experimental. (Figura 4)

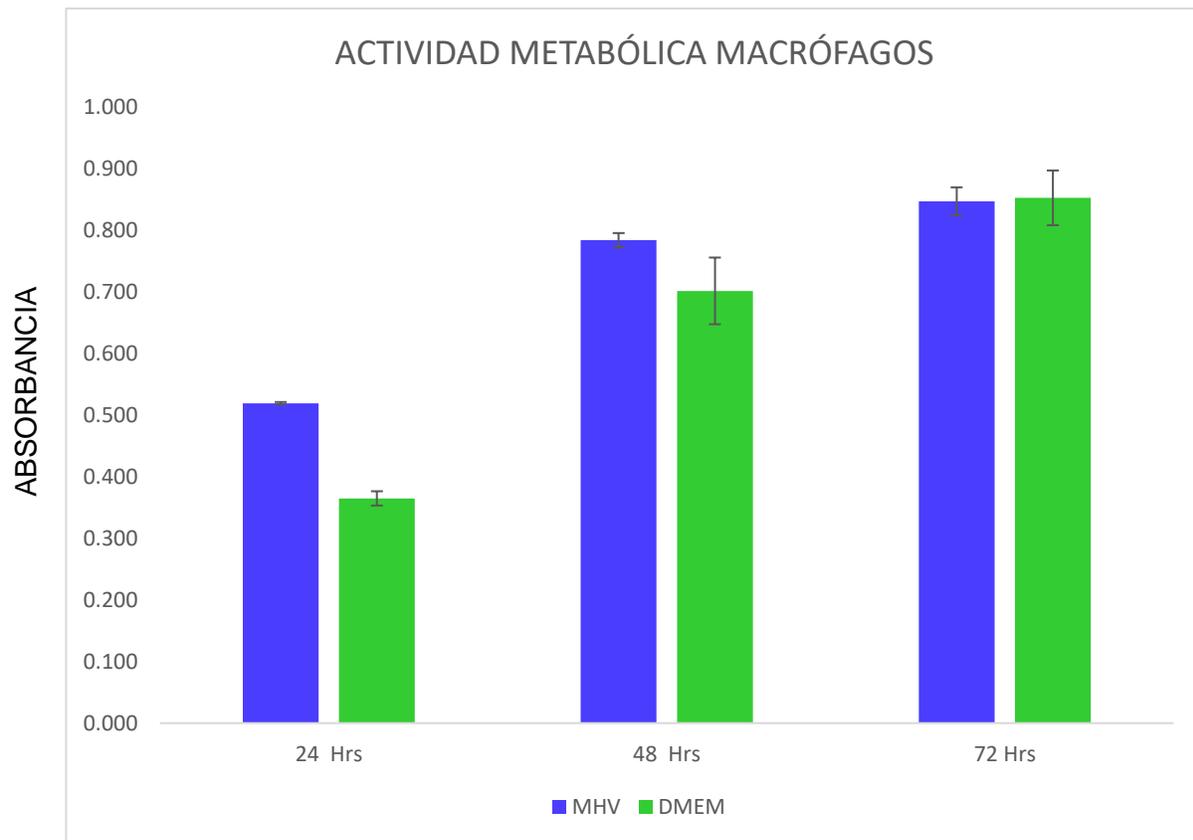


Figura 4. Absorbancias de los ensayos de MTT con Mø *P<0.05. sin diferencia estadísticamente significativa después de 72 H.

En la línea celular AD-MSCs (Figura 5) expuesto a los extractos de MEC se registraron mayores tasas de actividad metabólica en comparación con el grupo control en cada uno de los tres tiempos de evaluación.

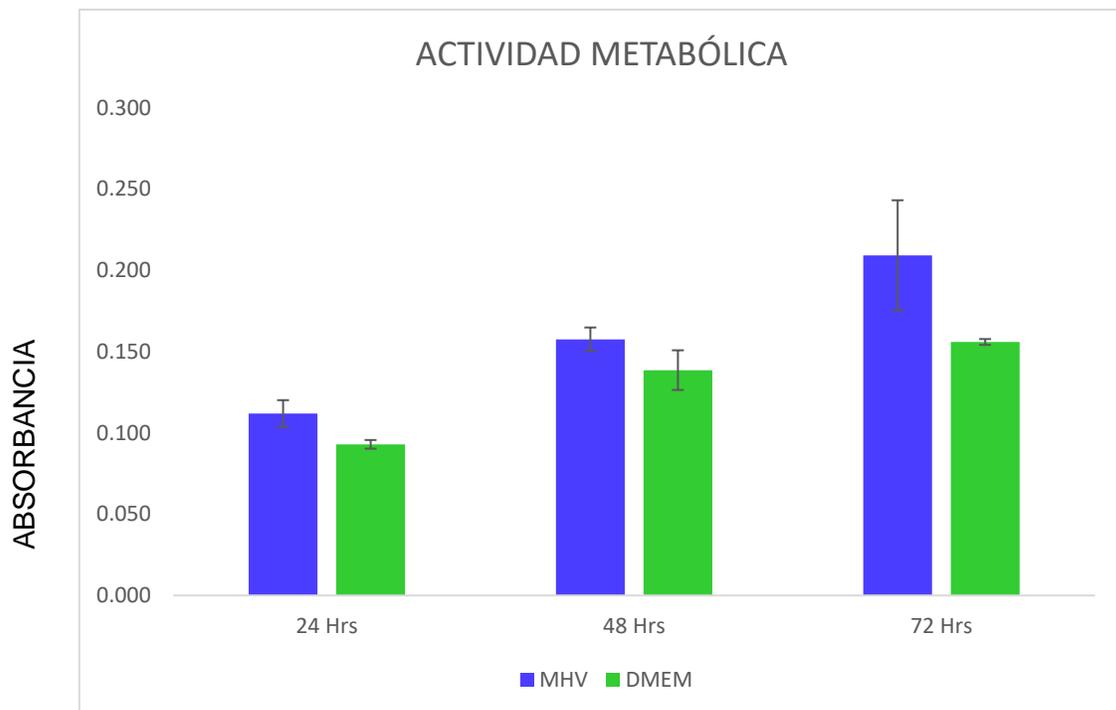


Figura 5. Absorbancias de los hidrogel de MTT con AD-MSCs a 24, 48 y 72 H.
***P<0.05** Diferencia estadísticamente significativa de actividad metabólica de AD-MSCs sobre grupo control.

Los ensayos de biocompatibilidad indican que los extractos de MEC no afectan funciones básicas para la sobrevivencia como lo son la adherencia, migración y proliferación celular.

8.3 EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA CELULAR

8.3.1 MACRÓFAGOS

En las microfotografías en campo claro a 40X se evaluó la morfología celular en contacto con hidrogeles de MEC de vejiga porcina, así como del grupo control a 24,48 y 72hrs. Se observó adhesión celular a la placa de cultivo y morfología celular típica sin activación, ya que no se observaron núcleos celulares de gran tamaño, así como extensiones citoplasmáticas. En los grupos se desarrollaron conglomerados celulares permitiendo interacción célula-célula y establecimiento de colonias (Figura 6).

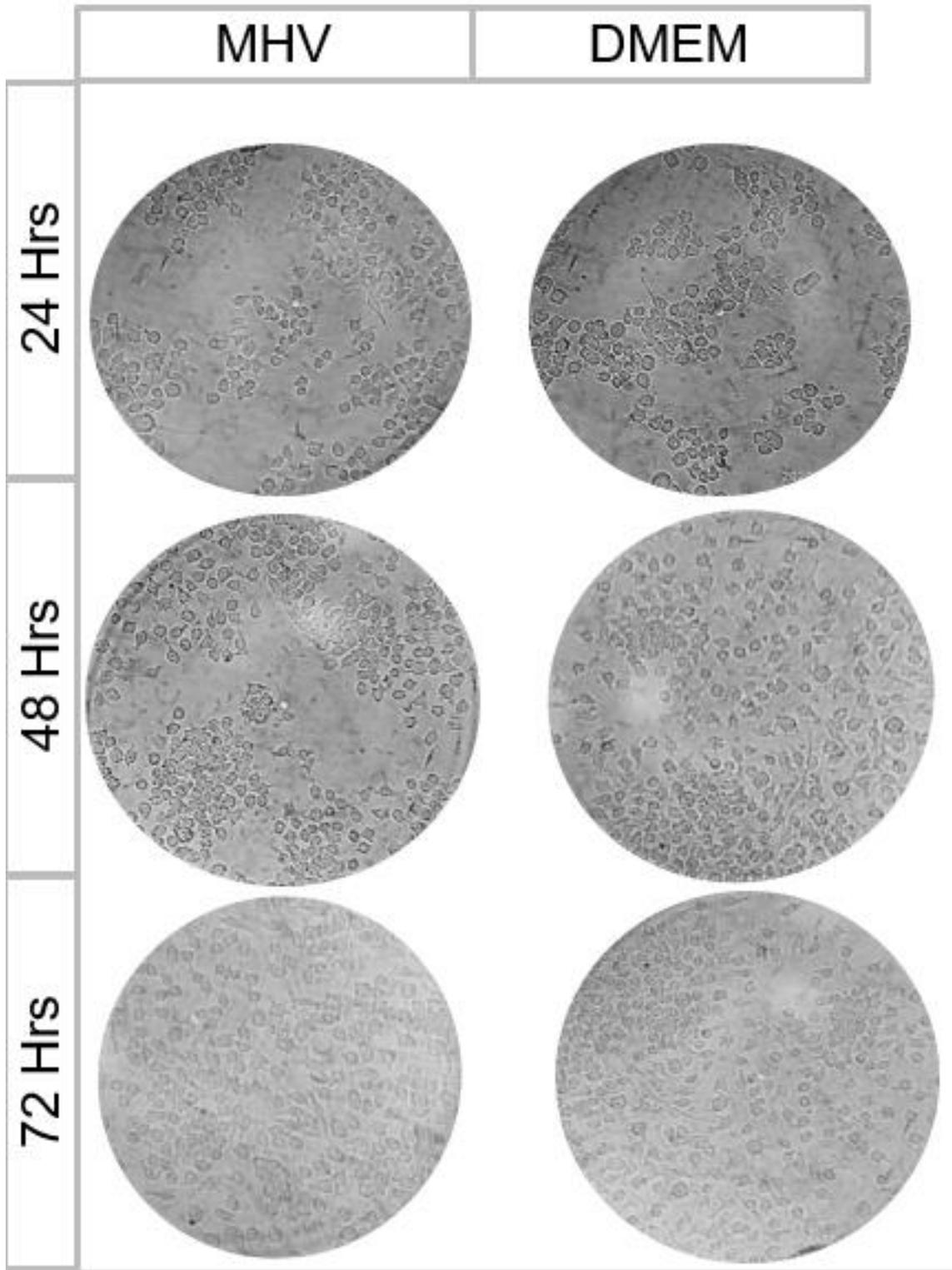


Figura 6. Microfotografía a 40X de Macrófagos ensayo MTT a 24,48 y 72 H

8.3.2 CÉLULAS MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO.

La morfología celular de la estructura de las AD-MSCs no se vio afectada en los 3 tiempos del ensayo, presentándose una morfología típica tipo fibroblastoide. Las células se encontraban adheridas al plástico, esto se pudo inferir ya que se mostraban de forma larga y aplatada. No se observó activación celular ya que estas no presentaban vesículas citoplasmáticas. Con esto se puede inferir que la MEC de vejiga porcina no afecta la morfología de estas células así mismo no induce una activación de estas ya que al ser comparadas al grupo de investigación de control, la morfología celular era similar.

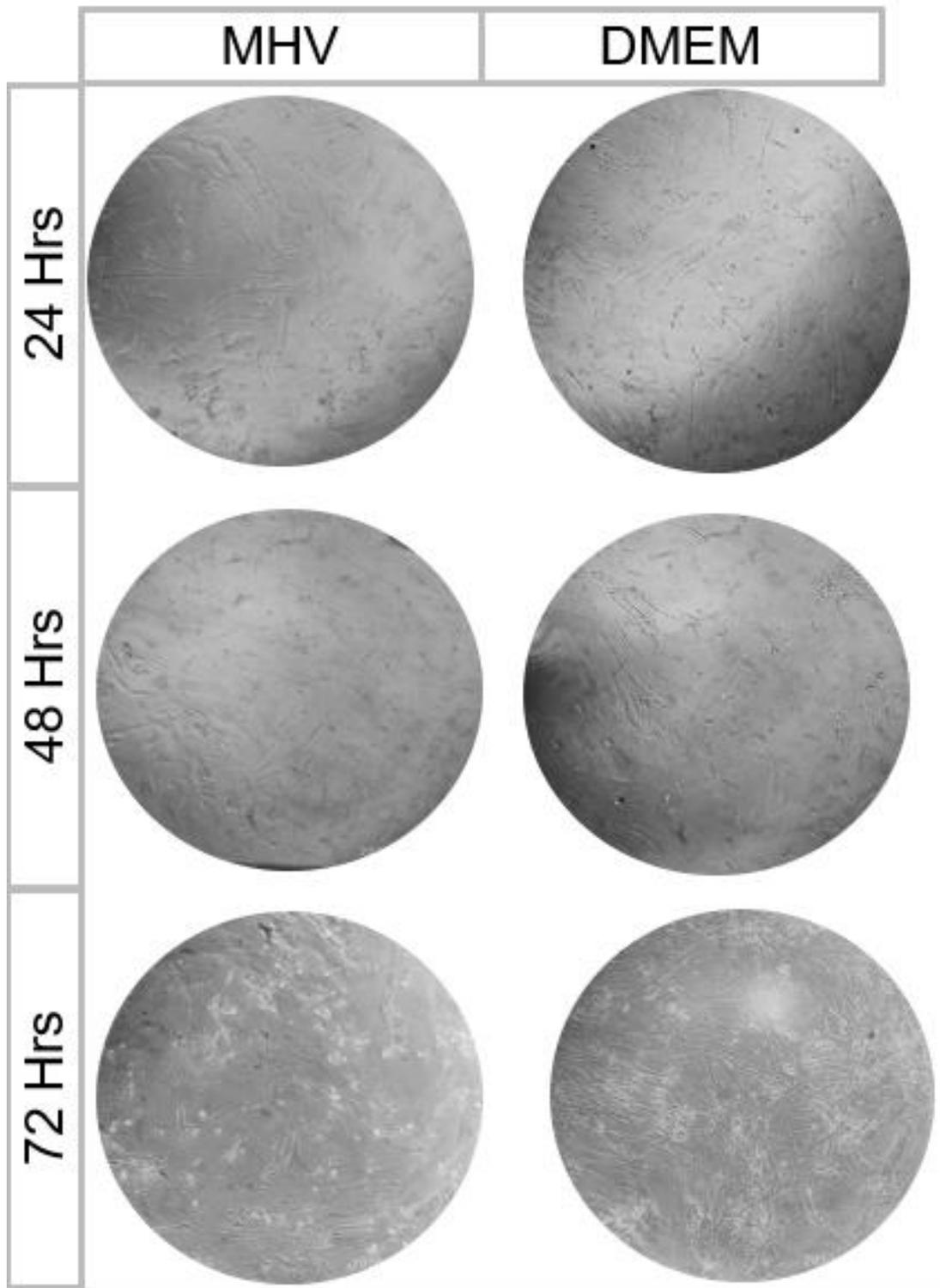


Figura 7. Microfotografía a 40X de Células Mesenquimales de tejido adiposo en ensayo MTT a 24,48 y 72 H.

9 DISCUSIÓN

La comparación de los resultados con la evidencia disponible se dificulta por la gran cantidad de sistemas experimentales *in vitro* utilizados. Las variaciones en los modos de cultivar las células, bien sea cultivo con los extractos de los materiales o en contacto directo con el hidrogel.

En estudio similar Linero et al. (37); comprobó que los hidrogeles de plasma sanguíneo sobre (AD-MSCs) estas son capaces de proliferar y presentar baja citotoxicidad a las 24,48 y 72 horas. indicando que los hidrogeles proporcionan un microambiente adecuado para las células al igual que el hidrogel de nuestro estudio.

Rosario et al. (32); Evaluaron la biocompatibilidad de una (MHV) mediante ensayo MTT sobre células estromales, mostrando buena actividad metabólica a 24, 48, 72 y 96 horas, en el cual coincide en los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Alvarez-Barreto et al. (38); Realizaron un estudio para ver la proliferación de MSC sobre un hidrogel de quitosano y nanopartículas de hidroxiapatita, demostrando que las MSC son capaces de proliferar en periodos de hasta 16 días, similares a los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde en un periodo de 24,48 y 72 horas se mantuvo la constante de mayor proliferación a mayor tiempo de estudio.

Sawkins et al. (39); Evaluaron la capacidad de proliferación de células de la calota de rata, sobre un hidrogel de matriz ósea bovina, mostrando un aumento de osteoblastos. Resultados similares obtenidos en nuestro estudio al evaluar MHV sobre células mesenquimales.

Reing et al. (40); En su estudio sobre hidrogel de MEC de vejiga urinaria porcina, de grado enzimáticamente con pepsina y papaína para determinar las propiedades quimio atrayentes de migración sobre MSCs y células endoteliales, mostrando como resultado actividades quimiotácticas y mitogénicas para las células, inhibiendo tanto la quimiotaxis como la proliferación. A diferencia de nuestro estudio donde se obtuvieron tasas positivas de reclutamiento celular tanto de MSC como macrófagos.

Bulman et al. (41); Utilizando un hidrogel de pulpano evaluó la proliferación, actividad metabólica, diferenciación de MSCs, por tres hasta siete días, mostrando que se mantenían. Al igual que en nuestro estudio se evaluó la proliferación de MSCs sobre hidrogeles de MHV manteniendo la proliferación por 24,48 y 72 horas.

10 CONCLUSIONES

De acuerdo con nuestro estudio el hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina presentó buena biocompatibilidad sobre células mesenquimales y macrófagos, las cuales son importantes en la respuesta del sistema inmunológico y regeneración tisular, obteniendo baja citotoxicidad y manteniendo buena actividad metabólica, estas características son fundamentales para la utilización de este hidrogel en la terapia de regeneración de tejidos.

Es de vital importancia que las células conserven su capacidad de proliferación y diferenciación en el momento de posicionarse sobre los bioandamios, lo que nos sugiere MHV podría ser un buen bioandamio en la terapia de regeneración de tejidos. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales *in vivo* para corroborar esta conclusión.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Spang MT, Christman KL. Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo applications and development. *Acta Biomaterialia*. 2018;1–14.
2. Bae KH, Wang LS, Kurisawa M. Injectable biodegradable hydrogels: Progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013;1(40):5371–88.
3. Bai X, Gao M, Syed S, Zhuang J, Xu X, Zhang X. Bioactive Materials Bioactive hydrogels for bone regeneration. *Bioactive Materials*. 2018;3(4):401–17.
4. Lee S, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering ☆. 2007;59:339–59.
5. Rosario DJ, Reilly GC, Salah EA, Glover M, Bullock AJ, MacNeil S. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regenerative Medicine*. 2008;3(2):145–56.
6. José F. Siqueira J. o o o ORAL MEDICINE ORAL PATHOLOGY. *Oral Surgery, oral medicine, oral pathology*. 2002;94(3):281–93.
7. Machado CAD, Souza ACA, Loureiro C, Martinho FC, Cintra LTÂ, Junior ED, et al. Comparison of two rotary systems in bacteria/lps removal from endodontic infections: Randomized clinical trial. *Brazilian Oral Research*. 2019;33:1–9.
8. Yábar-villafuerte G, Becerra-quñones Y, Obando-pereda GA. in bone-repair endodontic procedures . *Uso del plasma rico en fi brina en endodoncia*. 2018;22(2):99–102.
9. Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*. 2017;49:1–15.
10. Meruane M, Rojas M. Células troncales derivadas del tejido adiposo. *International Journal of Morphology*. 2010;28(3):879–89.
11. Elena M, Manrreza C, José J, Montesinos M. Células troncales mesenquimales : biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas. *Rev Med UV*. 2015;38–44.
12. Meruane M, Rojas M. Células troncales derivadas del tejido adiposo. *International Journal of Morphology*. 2010;28(3):879–89.

13. Kenneth E, Hargreaves M, Berman LH. Cohen. Vías de la Pulpa UNDÉCIMA EDICIÓN.
14. Garcia SN, Gutierrez L, McNulty A. Real-time cellular analysis as a novel approach for in vitro cytotoxicity testing of medical device extracts. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2013 Jul;101 A(7):2097–106.
15. Zhang L, Zhang F, Weng Z, Brown BN, Yan H, Ma XM, et al. Effect of an inductive hydrogel composed of urinary bladder matrix upon functional recovery following traumatic brain injury. *Tissue Engineering - Part A*. 2013;19(17–18):1909–18.
16. Keong LC, Halim AS. In Vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan derivatives in wound management. Vol. 10, *International Journal of Molecular Sciences*. 2009. p. 1300–13.
17. Bernard M, Jubeli E, Pungente M, Yagoubi N, Sci B. *Biomaterials Science*. 2016 [cited 2021 Nov 17];4. Available from: www.rsc.org/biomaterialsscience
18. Polo-corrales L, Latorre-esteves M, Ramirez-vick JE. Scaffold Design for Bone Regeneration. 2014;14(1):15–56.
19. Carano RAD, Filvaroff EH, Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair *Bone healing*. 2003;8(21):980–9.
20. Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*. 2017;1–15.
21. Y. Filingham JJ. Bone Grafts and Their Substitues: Understanding The Three Os. *Orthopaedic Proceedings*. 2017;99(SUPP_7):55.
22. Wang W, Yeung KWK. Bioactive Materials Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair : A review. *Bioactive Materials*. 2017;
23. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2012;133–8.
24. Mehta S, Blagg R, Willcockson J, Gociman B, Yamashiro D, Siddiqi F. Cost-effectiveness analysis of demineralized bone matrix and rhBMP-2 versus autologous Iliac crest bone grafting in alveolar cleft patients. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2018;142(3):737–43.

25. Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2019;83–95.
26. Caliarì SR, Burdick JA, Terms BOXKEY. REVIEW A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Publishing Group*. 2016;13(5):405–14.
27. Benmassaoud MM, Gultian KA, DiCerbo M, Vega SL. Hydrogel screening approaches for bone and cartilage tissue regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2020;25–42.
28. Caliarì SR, Burdick JA, Terms BOXKEY. REVIEW A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Publishing Group*. 2016;13(5):405–14.
29. Escobar JL, García DM, Zaldivar D, Katime I. Hidrogeles. Principales Características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2002;1–28.
30. Kim H, Guo TW, Wu AP, Wells A, Gertler FB, Lauffenburger DA. Epidermal Growth Factor – induced Enhancement of Glioblastoma Cell Migration in 3D Arises from an Intrinsic Increase in Speed But an Extrinsic Matrix- and Proteolysis-dependent Increase in Persistence. 2008;19(October):4249–59.
31. Ratner BD, Schoen FJ. The Concept and Assessment of Biocompatibility.
32. Rosario DJ, Reilly GC, Salah EA, Glover M, Bullock AJ, MacNeil S. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regenerative Medicine*. 2008;3(2):145–56.
33. J. LeCheminant. Porcine urinary bladder matrix a retrospective study and establishment of protocol.
34. Bolland F, Korossis S, Wilshaw SP, Ingham E, Fisher J, Kearney JN, et al. Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007 Feb;28(6):1061–70.
35. Liu L, Deng L, Wang Y, Ge L, Chen Y, Liang Z. Porcine urinary bladder matrix-polypropylene mesh: A novel scaffold material reduces immunorejection in rat pelvic surgery. *International Urogynecology Journal*. 2012;23(9):1271–8.
36. Liu L, Li D, Wang Y, Xu H, Ge L, Liang Z. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic (porcine) extracellular matrix (ECM)

- scaffold for pelvic reconstruction. *International Urogynecology Journal*. 2011;22(2):221–7.
37. Linero IM, Doncel A, Chaparro O. Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. *Biomedica*. 2014;34(1):67–78.
 38. Alvarez-Barreto J, Márquez K, Gallardo E, Moret J, Benítez N, Meyer M, et al. Cultivo de células madre mesenquimales sobre hidrogeles compuestos de nanopartículas de hidroxiapatita y quitosano foto-entrecruzable. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*. 2017 Sep 1;38(3):524–36.
 39. Sawkins MJ, Bowen W, Dhadda P, Markides H, Sidney LE, Taylor AJ, et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(8):7865–73.
 40. Reing JE, Zhang L, Myers-Irvin J, Cordero KE, Freytes DO, Heber-Katz E, et al. Degradation Products of Extracellular Matrix Affect Cell Migration and Proliferation.
 41. Bulman SE, Coleman CM, Murphy JM, Medcalf N, Ryan AE, Barry F. Pullulan: A new cytoadhesive for cell-mediated cartilage repair. *Stem Cell Research and Therapy*. 2015 Mar 19;6(1).

12 ANEXOS

12.1 PROCEDIMIENTO ENSAYO MTT

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

12.2 PROCEDIMIENTO LDH

1. Las células AD-MSCs y Mo obtenidos se desprenderán de la caja de cultivo agregando 500 μ l de tripsina-EDTA 0.25% e incubando 5 minutos a 37 °C.
2. Se colocará la suspensión celular en un tubo falcon de 15 ml y se centrifugará a 1500 rpm durante 5 minutos.
3. Se decantará el sobrenadante y el pellet celular se resuspenderá en 1 ml de medio de cultivo para determinar la concentración y viabilidad celular en cámara de Neubauer mediante la tinción con azul de tripano.
4. Se sembrarán en una caja de 96 pozos 2,000 células en 200 μ l de medio de cultivo condicionado y se incubarán 2 horas a 37 °C Después de la incubación se agregarán las diversas concentraciones de los materiales a evaluar y se incubarán horas a 37 °C.
5. Terminada la incubación se retirará el medio de cultivo y se lavará con PBS 1x, se transferirán 50 μ l de los sobrenadantes a un pozo nuevo y 50 μ l del mix de substrato LDH-solución de tinción-cofactor y se incubará a temperatura ambiente durante 30 minutos protegida de la luz en aluminio
6. La reacción se detendrá con 10 μ l de HCl 1 N.