

DESARROLLO DE UN HIDROGEL COMO SOPORTE PARA EL CULTIVO DE
CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS

NORMA CONSTANZA CARRETERO VILLANUEVA

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMÉDICAS
BOGOTA, COLOMBIA
2014

DESARROLLO DE UN HIDROGEL COMO SOPORTE PARA EL CULTIVO DE
CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS

NORMA CONSTANZA CARRETERO VILLANUEVA

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
MAGISTER EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS

DIRECTOR:

José Fernando Mikán Venegas, Ph.D.

CODIRECTORES:

Fadzil Ayad Zakaria, Ph.D.

Marien Villamil Preciado MSc.

GRUPOS DE INVESTIGACIÓN:

Biotecnología en Salud. Universidad Militar Nueva Granada
Biofísica Y Biología de Membranas. Centro Internacional de Física

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMÉDICAS
BOGOTA, COLOMBIA
2014

PALABRAS CLAVE:

- Osteoblastos
- Hidrogel
- Colágeno
- Biomaterial
- Apatita Carbonatada
- Polivinil alcohol

RESUMEN:

En la actualidad anualmente, hay alrededor de 4'000.000 de cirugías relacionadas con sustitutos de injerto óseo a nivel mundial (Brydone *et al*, 2010). Los implantes usados como soporte en dichas cirugías para la reparación de traumatismos o fracturas de gran tamaño tienen un elevado costo, esta problemática revela la necesidad de fabricar nuevos biomateriales de bajo costo que puedan ser usados como matrices para el cultivo de células madre autólogas, y que favorezcan la integración del implante. Se ha considerado el uso de polímeros o de materiales compuestos para el desarrollo de matrices con propiedades osteoconductoras que estimulen la proliferación de células osteogénicas cultivadas previamente a la implantación.

El polivinil alcohol (PVA) es un polímero del cual pueden obtenerse hidrogeles por procedimientos relativamente económicos, con características físico-químicas que dependen de la concentración y del método de preparación. Los hidrogeles de PVA se caracterizan por no ser citotóxicos, ni genotóxicos y por tener una alta integridad mecánica ((1) Hassan *et al.*, 2000). Pueden mezclarse con materiales cerámicos, tales como la apatita carbonatada (CAp) y con proteínas como el colágeno que favorecen la adhesión celular y la expresión de marcadores característicos de la línea de diferenciación osteoblástica, lo que demostraría una mayor funcionalidad por parte de estos soportes compuestos. Teniendo en cuenta las características de este polímero, se planteó optimizar la síntesis un hidrogel compuesto por Polivinil alcohol-Colágeno tipo I- Apatita Carbonatada (PVA-Col I-CAp) como un soporte de matriz tridimensional con propiedades osteoconductoras y osteoinductivas. En el hidrogel se evaluó el crecimiento y la expresión de algunos marcadores de diferenciación osteoblástica de células aisladas de médula ósea de porcinos.

Para cumplir este objetivo, se estandarizó la síntesis de hidrogeles de PVA-Col I-CAp, en una proporción 6%(v/v) PVA de alto peso molecular, 94%(v/v) PVA de bajo peso molecular, 0,8% Colágeno tipo I y 0,6% Apatita carbonatada. Para esto se utilizó CAp preparada de acuerdo al protocolo descrito por Zakaria *et al.*, 2009 y se realizó la extracción de colágeno tipo I en el laboratorio a partir de piel de feto de bovino por medio de la modificación del protocolo propuesto por Gross *et al.*, 1955. Sobre el hidrogel propuesto y para evaluar su comportamiento como soporte, se realizó el cultivo primario de células osteoprogenitoras de médula ósea de porcino según el protocolo descrito por Mikan *et al.*, 2009. Posterior a la siembra de células, se compararon los fenotipos, la proliferación celular y se analizó la expresión de marcadores transcripcionales asociados con el compromiso de células a linaje osteoblástico por RT-PCR. Paralelamente, se comparó funcionalmente la actividad fosfatasa alcalina y la formación de matriz mineralizada por las células sembradas en distintos tiempos de experimentación. Esta investigación concluyó con la obtención de un hidrogel osteoconductor, osteoinductor, apto para la estimulación de células a la diferenciación ósea.

Esta investigación permitió desarrollar una matriz tridimensional para el estudio de la diferenciación osteoblástica y contribuyó a la descripción de un modelo de diferenciación *in vitro* en una matriz. Además, se espera incentivar el desarrollo tecnológico de materiales fabricados en nuestro país, que fortalezcan el conocimiento y desarrollo en el área de biomateriales.

KEYWORDS:

- Osteoblast
- Hydrogel
- Collagen
- Biomaterial
- Carbonated Apatite
- Polyvinyl alcohol

ABSTRACT:

Today annually, there are about 4'000.000 surgeries related to bone graft substitutes around the world (Brydone *et al*, 2010). The implants that are used like support in those surgeries for trauma or large fractures repair have high cost, that problematic reveal the need to manufacture new biomaterials to reduce the cost which can be used as culture scaffolds of autologous stem cells and promoting the integration of the implant. We have considered the use of polymers or composite materials for the development of scaffolds with osteoconductive properties that stimulate proliferation of osteogenic cultured cells prior to implantation.

The polyvinyl alcohol (PVA) is a polymer from which hydrogels can be obtained for relatively economical methods, with physic-chemical characteristics that depend on both concentration and method of preparation. PVA hydrogels are characterized by not being cytotoxic nor genotoxic and having a high mechanical integrity ((1) Hassan *et al.*, 2000). They can be mixed with ceramic materials, such as carbonated apatite (CAp), and proteins as the collagen that promote cell attachment and expression of molecular markers that are characteristic of the osteoblastic differentiation line, this would demonstrate that these compound materials are more functional. Due to the feature of the polymer, it was propose to synthesize polyvinyl alcohol hydrogel –Type I Collagen - Carbonated apatite (PVA- Col I- CAp) as a three-dimensional matrix scaffold with osteoconductive and osteoinductive properties. Growth and the expression of some osteoblast differentiation markers was assessed in bone marrow cells isolated from pigs and cultured on the hydrogel.

To get this goal, a protocol for the synthesis of PVA -Col I- CAp hydrogels were evaluated and standardized in the laboratory, on a proportion 6%(v/v) High molecular weight PVA, 94%(v/v) Low molecular weight PVA, 0,8% Collagen y 0,6% Carbonated Apatite. For this procedure were used CAp prepared according to the protocol described by Zakaria *et al.*, 2009 and laboratory

extracted type I collagen from bovine fetus skin through the modification of the Gross *et al.*, 1955 protocol. Above the propose hydrogel and for the evaluation of its behavior as a tissue support its been made a culture of porcine bone marrow osteoprogenitor cells was used according to the protocol described by Mikan et al., 2009. After cell seeding, the phenotypes are compared, cell proliferation and expression of transcriptional markers by RT -PCR were associated with the commitment of osteoblastic lineage cells were analyzed. Simultaneously, the alkaline phosphatase activity and mineralized matrix formation were compared in the cells cultured on different experimental days. This investigation conclude with the production of a hydrogel osteoconductive, osteoinductive and suitable for osteogenic differentiation stimulation.

This investigation let to develop a three-dimensional matrix for studying osteoblast differentiation and contributed to the description of a model of in vitro differentiation in a matrix. Also, is expected to encourage the technological development of manufactured materials in our country, to strengthen the knowledge and development in the area of biomaterials.

CONTENIDO

- i. LISTA DE FIGURAS
- ii. LISTA DE TABLAS
- iii. LISTA DE ANEXOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEORICO.....	4
2.1	Función y estructura del hueso.....	4
2.2	Ingeniería de tejidos	7
2.3	Biomateriales	8
2.4	Hidrogeles.....	10
2.5	Polivinil alcohol.....	11
2.6	Apatita Carbonatada.....	13
2.7	Antecedentes.....	15
3.	OBJETIVOS.....	17
3.1	Objetivo principal.....	17
3.2	Objetivos específicos	17
4	METODOLOGIA.....	18
4.1	Síntesis de hidrogeles de PVA-Col I-CAp.....	18
4.2	Cultivo primario de células de medula ósea de porcino	20
4.2.1	Determinación del potencial de osteoconductividad y osteoinductividad de la matriz de PVA-Col I-CAp	21
4.2.1.1	Determinación del potencial de osteoconductividad de la matriz de PVA-Col I-CAp	21
4.2.1.1.1	Morfología celular	21
4.2.1.1.2	Determinación del número de células	22
4.2.1.2	Determinación del potencial osteoinductivo de la matriz de PVA-Col I-CAp.....	22
4.2.1.2.1	Actividad Fosfatasa Alcalina (APL)	22
4.2.1.2.2	Formación de nódulos mineralizados.....	22
4.2.1.2.3	Determinación de marcadores moleculares.....	23
5	RESULTADOS	25

5.1	Síntesis de hidrogeles de PVA-Col I-CAp	25
5.1.1	Presencia de poros con tamaño superior a 100µm y morfología irregular	27
5.1.2	Insolubilidad	30
5.1.3	Disolución	35
5.1.4	Tasa de absorción y volumen de poro	38
5.1.5	Difracción de rayos X (XRD)	40
5.1.6	Espectro Infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR)	42
5.1.7	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	44
5.1.8	Polivinil alcohol – Apatita Carbonatada (CAp)	49
5.1.9	Colágeno	50
5.1.10	Polivinil alcohol – Colágeno tipo I – Apatita Carbonatada	53
5.2	Cultivo primario de células de la médula ósea de porcino	57
5.2.1	Determinación del potencial de osteoconductividad de la matriz de PVA-Col I-CAp	58
5.2.1.1	Morfología Celular	58
5.2.1.2	Determinación del número de células	64
5.2.2	Determinación del potencial de osteoinductividad de la matriz de PVA-Col I-CAp	66
5.2.2.1	Actividad Fosfatasa Alcalina (APL)	66
5.2.2.2	Formación de nódulos de mineralización	68
5.2.2.3	Determinación de marcadores moleculares	71
6.	DISCUSION	76
7.	CONCLUSIONES	93
8.	RECOMENDACIONES	94
9.	BIBLIOGRAFIA	95
10.	ANEXOS	105

i. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tratamiento Dehidrotermal.....	26
Figura 2. Tamaño y morfología de poro.....	28
Figura 3. Porcentaje de frecuencia para tamaño de poro.....	29
Figura 4. Prueba de insolubilidad.....	33
Figura 5. Comparación de la apariencia de hidrogeles de PVA.....	35
Figura 6. Efecto de los ciclos de C/DC en la disolución.....	36
Figura 7. Efecto de la proporción de PVA en la disolución.....	37
Figura 8. Tasa de hidratación Q.....	39
Figura 9. Efecto de la proporción de PVA evaluado por XRD.....	41
Figura 10. Efecto de los ciclos de C/DC evaluado por XRD.....	42
Figura 11. Efecto de los ciclos C/DC evaluado por FTIR.....	43
Figura 12. Efecto de la proporción de PVA evaluado por FTIR.....	44
Figura 13. Efecto de los ciclos C/DC evaluado por DSC tratamiento 6:94.....	46
Figura 14. Efecto de los ciclos C/DC evaluado por DSC tratamiento 8:92.....	46
Figura 15. Efecto de las proporciones de PVA evaluado por DSC.....	47
Figura 16. Porcentaje de cristalinidad.....	48
Figura 17. Tamaño de los cristales.....	49
Figura 18. Soluciones de Colágeno.....	51
Figura 19. Corrido Electroforético Colágeno.....	52
Figura 20. Dot Blot Colágeno.....	52
Figura 21. Sistema de congelación final.....	53
Figura 22. Hidrogeles PVA-Col I-Cap.....	54
Figura 23. SEM para PVA-Col I-Cap.....	54
Figura 24. Difractograma XRD para PVA-Col I-Cap.....	55
Figura 25. Espectro FTIR para PVA-Col I-Cap.....	56
Figura 26. Morfología celular a través del tiempo.....	59
Figura 27. Tinción con Hematoxilina-Eosina y Tricromico de Masson.....	61
Figura 28. SEM para hidrogel con y sin células.....	62
Figura 29. SEM para cultivo celular en el tiempo.....	62
Figura 30. Nódulos de calcio por SEM.....	63
Figura 31. Número de células por actividad hexosaminidasa.....	66

Figura 32. Actividad fosfatasa alcalina (APL).....	68
Figura 33. Tinción con Xilenol Orange blanco.....	69
Figura 34. Tinción con Xilenol Orange, células de la medula ósea.....	70
Figura 35. Tinción con Xilenol Orange, células ATCC.....	71
Figura 36. Marcadores moleculares para células sobre placa.....	73
Figura 37. Marcadores moleculares para células sobre hidrogel.....	74
Figura 38. Marcadores moleculares para células pre-osteoblastos humanos.....	75

ii. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Insolubilidad del PVA proporción 3:97.....	31
Tabla 2. Insolubilidad del PVA proporción 5:95.	31
Tabla 3. Insolubilidad del PVA proporción 6:94.	32
Tabla 4. Insolubilidad del PVA proporción 8:92.	32
Tabla 5. Insolubilidad del PVA proporción 10:90.	32
Tabla 6. Datos de la tasa de hidratación.....	39
Tabla 7. Porcentaje de porosidad.....	40
Tabla 8. Datos de análisis DSC.....	45
Tabla 9. Datos DSC para PVA-Col I-CAp.....	56

iii. LISTA DE ANEXOS

Anexo # 1. Monitoreo de la congelación final en los hidrogeles de PVA.....	105
Anexo # 2. Tamaño y morfología de los poros.....	107
Anexo # 3. Evaluación del área de poros para cada tratamiento.....	111
Anexo # 4. Ensayo de insolubilidad de los hidrogeles de PVA.....	119
Anexo # 5. Datos absorbancias disolución.....	124
Anexo # 6 Tasa de hidratación.....	128
Anexo # 7. Protocolo para la extracción de colágeno.....	130
Anexo # 8. Cuantificación por el método Bradford del Colágeno.....	131
Anexo # 9. Protocolo del Corrido Electroforético del Colágeno.....	132
Anexo # 10. Protocolo Dot Blot.....	133
Anexo # 11. Protocolo para la elaboración del hidrogel compuesto por PVA – Colágeno tipo I – Apatita carbonatada.....	134
Anexo # 12. Curva estándar de actividad hexosaminidasa de células de medula ósea sobre placa de cultivo.....	135
Anexo # 13. Curva estándar de actividad hexosaminidasa de células de medula ósea sobre placa hidrogel PVA-Col I-CAp.....	136
Anexo # 14. Curva estándar de actividad hexosaminidasa de células de línea de pre- osteoblastos ATCC sobre hidrogel PVA-Col I-CAp.....	137
Anexo # 15. Curva estándar de actividad hexosaminidasa de células de línea VERO sobre hidrogel PVA-Col I-CAp.....	138
Anexo # 16. Datos de absorbancias y cálculos para graficar los datos de actividad Hexosaminidasa para conteo celular.....	139
Anexo # 17. Curvas estándar de p-nitrofenol-fosfato para APL.....	140
Anexo # 18. Datos de absorbancias y cálculos para graficar los datos correspondientes a Actividad Fosfatasa Alcalina.....	141

1. INTRODUCCION

La pérdida de tejidos cuyo tratamiento requiere del uso de implantes es un tema de salud de gran relevancia mundial, la ocurrencia de defectos óseos producidos por malformaciones congénitas, tumores, infecciones óseas, traumatismos por accidentes y/o conflictos armados que implican fracturas con pérdida de hueso, entre otros va en aumento y se ha comprobado que tratar correctamente estos traumatismos incrementa el promedio en la expectativa de vida de las personas afectadas. La década de 2000-2010 fue declarada la "Década de los Huesos y las Articulaciones" por las Naciones Unidas, con el propósito de generar conciencia del impacto que desencadenan los problemas ortopédicos en la salud humana y promover la investigación y desarrollo tecnológico en esta área. La "American Academy of Orthopaedic Surgeons" reportó en 1995 tres millones de procedimientos ortopédicos en hospitales de los Estados Unidos, y alrededor de 1'230.000 fracturas tratadas al año usando material osteosintético, de las cuales el 80% requirieron injertos (Boskey, 2003). Solo en los Estados Unidos se estima que se producen cerca de 280.000 fracturas de cadera, 700.000 vertebrales y 250.000 fracturas de muñeca cada año a un costo de \$10 millones de dólares. De estos casos se considera que hay reparación incompleta en el 5% de los casos y el 20% es considerado fractura de alto impacto. Se considera entonces que hay alrededor de 4'000.000 operaciones relacionadas con sustitutos de injerto óseo actualmente en todo el mundo anualmente, por lo que las investigaciones en esta área están en aumento debido a la gran demanda (Brydone *et al*, 2010).

Los tratamientos más comúnmente utilizados para el tratamiento de estas heridas, con diferentes grados de éxito, son los implantes autólogos (obtenidos del mismo individuo) y los aloimplantes (obtenidos de otro individuo de la misma especie) (Zapanta, 2002; Woodard *et al*, 2007). Sin embargo, se han observado diferentes riesgos y complicaciones como la limitación en la disponibilidad del tejido sano, el caso de los autoimplantes, por lo que no se pueden tratar heridas de gran tamaño y la reacción inmune en el donante, transmisión de enfermedades y el uso de material comprometido, en el caso de los aloimplantes. A esto se suman la alta inversión económica, el tiempo de recuperación, el desgaste emocional de los pacientes y la posibilidad de fracaso al momento del implante; por lo tanto, el desarrollo de nuevos materiales biomiméticos que funcionen como matrices tridimensionales que permitan el alojamiento de células osteoprogenitoras, preferiblemente autólogas, es prioritario.

Los materiales actualmente más usados son los metales, los cerámicos y los polímeros. Los primeros, al no tener la capacidad de interactuar con el tejido circundante, pueden desarrollar efectos negativos en el paciente como intolerancia además de no garantizar la reparación completa del defecto (Jaiswal *et al.*, 1997; Ringe *et al.*, 2002). Los demás son clasificados entre el grupo de los “activadores” ya que reaccionan con los tejidos generando una respuesta de las células adyacentes activando su proliferación y actividad regenerativa, generando la reparación del defecto (Beniker *et al.*, 2003; Neel, 2003). La ingeniería de tejidos ofrece como alternativa soportes sintéticos como los hidrogeles, que en combinación con células osteoprogenitoras y factores de crecimiento favorecen el desarrollo de tejido óseo autólogo.

En la actualidad, Colombia no cuenta con diseños propios de biomateriales para la regeneración ósea y las pocas investigaciones que hay en desarrollo sobre este tema están aun en fase experimental, donde presentan limitaciones en cuanto a efectividad y diseño. Por consiguiente a la hora de tratar traumatismos que requieran implantes se utilizan principalmente soportes de tipo metálico o en baja proporción biomateriales, los cuales en su mayoría son importados, lo que genera un incremento en el costo para la adquisición del mismo por parte del paciente. Los biomateriales en cuestión, generalmente no pueden ser reproducidos en el país ya que los materiales y/o equipos necesarios para su elaboración son de muy alto costo, no se encuentran disponibles o los diseños están protegidos bajo patentes lo que no permite reducir sus costos.

Por eso surge la necesidad de desarrollar metodologías innovadoras para la fabricación de biomateriales con estructura tridimensional, que alcancen los estándares requeridos a nivel internacional para que sean clasificados como materiales aptos para la regeneración ósea pero que al mismo tiempo sean de elaboración simple, a bajo costo y con tecnología propia que puedan ser usados en un principio como vehículo de células osteoprogenitoras autólogas, con propiedades osteoconductoras y/o osteoinductivas, no citotóxicos ni genotóxicos y que generen bioactividad e integración ósea, seguidas por reparación y regeneración del tejido circundante al implante, los cuales puedan ser evaluados directamente en el país para su aprovechamiento a nivel local, estos tendrían la ventaja de ser elaborados con la tecnología disponible y se encontrarían al alcance directamente de la población afectada.

Estudios previos del grupo de investigación de Biotecnología en salud de la Universidad Militar Nueva Granada sugieren fuertemente la alta capacidad osteoconductoras de la Apatita Carbonatada (CAp) (Diaz, 2006; Mikán *et al.*, 2009; Zakaria *et al.*, 2009; Carretero *et al.*, 2009) y continuando

con el aporte a la ingeniería de tejidos se ha incursionado en el diseño de biomateriales compuestos y se han hecho estudios preliminares en la fabricación de un hidrogel con base de PVA, Colágeno y nano-cristales de CAp (Villamil, 2009). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Villamil, 2009; el presente estudio pretendió optimizar el protocolo para la preparación del hidrogel compuesto por PVA-Col I- CAp, a este segundo prototipo de hidrogel se le denominó PCA. Los criterios de selección incluyeron porosidad, el mantenimiento aparente de la estructura y la baja disolución por lo menos durante un mes (tiempo de evaluación del cultivo *in vitro*), lo que permitiría el tiempo necesario para que las células puedan adherirse, multiplicarse y diferenciarse dentro de la estructura porosa del hidrogel.

El hidrogel seleccionado fue evaluado con el cultivo primario donde se usaran células en osteogénesis temprana, como las células de la médula ósea de porcino (Carretero, 2009), siguiendo un modelo previamente descrito (Mikan *et al.*, 2009), allí se indujeron a diferenciación por 35 días. Se analizó como posible biomaterial para la regeneración ósea a través de la evaluación *in vitro* de la capacidad osteoconductiva del hidrogel por medio de la adhesión y proliferación celular y evaluación de la posible capacidad osteoinductiva a través de análisis bioquímicos y la evaluación de la expresión de marcadores moleculares asociados y específicos de la línea de diferenciación osteoblástica así como la aparición de precipitados de fosfato de calcio en la matriz extracelular (Díaz, 2006; Carretero, 2009; Villamil, 2009).

En el país, la exploración y desarrollo de nuevos materiales para la regeneración ósea representa una contribución significativa sobre todo en aquellos ámbitos que carecen de tecnología y en los cuales podría haber un alto impacto en pro de metodologías simples, de bajo costo, con resultados aplicables, mejores resultados de recuperación, satisfacción y economía del paciente.

2. MARCO TEORICO:

2.1 Función y Estructura del Hueso

El sistema óseo cumple una importante función dentro del cuerpo ya que es un órgano con funciones mecánicas vitales como soporte y protección de los distintos órganos internos, además de servir como soporte hematopoyético y mantener los niveles mínimos de calcio necesarios para el funcionamiento normal del organismo (Amini *et al.*, 2012). Dentro de sus funciones está la continua remodelación en el tiempo, la cual consiste en la destrucción y formación de masa ósea. Los huesos se clasifican en dos tipos: El hueso cortical, compuesto por lamelas o platos compactos (alrededor del 80% de la masa esquelética) los cuales están dispuestos alrededor de canales centrales conocidos como sistema Harvesiano; esta distribución corresponde a que se encuentran principalmente en el esqueleto periférico y lo abastecen con nutrientes. El segundo tipo es el hueso trabecular (alrededor del 20% del esqueleto central o axial) (Marcus, 1987; Harada *et al.*, 2003). A nivel celular el tejido óseo está compuesto principalmente por células de origen mesenquimal, como las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos y las células de recubrimiento; todas estas cumplen un papel en la formación de matriz extracelular que funcionará como soporte, también esta compuesta por los osteoclastos de origen hematopoyético, encargados de la resorción ósea.

La matriz extracelular se compone por dos fases características, una fase orgánica y una inorgánica. La porción orgánica es la que esta presente en una mayor proporción, 90% aproximadamente y está constituida por colágeno (colágeno tipo I 97% y colágeno tipo V 3%) y la porción restante que corresponde al 10% esta compuesta por proteínas no colágenas como osteopontina, osteocalcina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína ósea, proteínas morfogenéticas de hueso, factores de crecimiento, proteoglicanos, entre otros, además de glicoproteínas, carbohidratos y lípidos (Anselme, 2000; Shekaran *et al.*, 2011). La matriz extracelular es sintetizada por los osteoblastos maduros y la proporción en la que están presentes cada uno de estas componentes es regulada por el estado de diferenciación de las células y la estructura de la matriz; en su mayoría las proteínas depositadas están relacionadas con la adhesión celular.

Un componente estructural importante en la matriz extracelular es la porción inorgánica, esta se compone principalmente por hidroxiapatita de calcio y fases no apatitas formadas por carbonato de calcio (CaCO_3) dolomita (CaMg CO_3), fosfato de octacalcio ($\text{Ca}_8\text{H}_2 (\text{PO}_4)_5\text{H}_2\text{O}$), entre otras. En el hueso la porción molar de Ca/P es de 1,67 y puede variar dependiendo de la edad, especie y tipo de

hueso. Adicionalmente, se ha observado que la fase de apatita no es pura, ya que puede contener iones de CO_3^- , HPO_4^{2-} , F, Cl^- , Mg^{+2} , Na^+ y K^+ (Zapanta, 2002). La proporción en la que esta presente el contenido mineral determina la fuerza y dureza del tejido óseo, sin embargo, el equilibrio que existe entre la fase orgánica y la inorgánica determina las propiedades mecánicas del hueso.

El tejido óseo esta conformado por una capa densa de células altamente especializadas, con alta similitud al tejido conectivo (Gronthos *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2002) y esta compuesto por una elaborada matriz extracelular que tiene como base estructural una malla formada por el entrecruzamiento de fibras de colágeno y cristales de sales de calcio que juntos conforman una estructura sólida resistente a la compresión, esta garantiza el soporte estructural del cuerpo y da protección a los órganos (Alberts *et al.*, 2002; Pilia *et al.*, 2013). En el sistema óseo la morfología de los huesos juega un papel importante en su estructura y organización celular, entre estos se evidencian dos tipos: Los compactos que son en su mayoría huesos de forma alargada en donde los depósitos de matriz calcificada se presentan de forma laminar mostrando múltiples interconexiones celulares (canaliculus) que sirven para el efectivo flujo de nutrientes entre las células superficiales y las que están internas entre la matriz y en el segundo grupo los reticulados que se caracterizan por ser estructuralmente menos compactos, compuestos en gran parte por numerosas trabéculas que le confieren una estructura más esponjosa (Alberts *et al.*, 2002).

La osteogénesis es un proceso vital en los huesos ya que al ser un órgano que esta en remodelación esta sujeto a la formación y resorción de nuevo hueso constantemente, esto mantiene a las células nuevas siempre en la línea directa de la diferenciación, de células mesenquimales a la línea osteogénica. Para que este proceso se lleve a cabo existen dos diferentes vías: la osificación endocondral y la intermembranosa, la primera que consiste en la transformación del cartílago en hueso, lo cual desencadena la formación de los huesos largos, y la segunda, consiste en la interacción entre las células mesenquimales y la matriz extracelular, depósitos generados por las células ya diferenciadas y que inducen la diferenciación de las nuevas células que llegan a la matriz. (Gilbert, 1997; Encina *et al.*, 1999; Ducy *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2005; Amini *et al.*, 2012).

La naturaleza activa del hueso hace que el componente celular esté igualmente en constante actividad. Las diferentes células óseas tienen la capacidad de modificar su rol según su madurez del hueso y los diferentes estímulos a los que estén expuestos. Entre estas se encuentran las células osteoprogenitoras, que ya cuentan con un compromiso en el linaje osteogénico, estas se ubican en

su mayoría en el periostio y o en la superficie que esta en contacto con la medula ósea y se caracterizan por que aún conservan su capacidad proliferativa (Mikic, 1996). Por otro lado los osteoblastos son las células encargadas de la formación del nuevo hueso ya que depositan la matriz extracelular. Este proceso inicia cuando los osteoblastos depositan lo que se denomina matriz osteoide, compuesta principalmente por colágeno tipo I que determina la organización estructural del hueso y forma una matriz fibrosa entrecruzada que funciona como soporte para la deposición de la porción mineral de la matriz y anclaje para las proteínas no colágenas, su estructura determinará la flexibilidad del tejido mineralizado (Lian, 2006; Reichert *et al.*, 2009; Pilia *et al.*, 2013).

La morfología y la bioquímica de los osteoblastos cambia según el estado de madurez; inicialmente su forma cambia de fibroblastoide a cuboide, simultáneamente se desencadena una activación en la expresión génica; iniciando por la expresión del factor *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) como un gen maestro y con su activación la posterior transcripción y expresión de las diferentes proteínas no colágenas (Javed *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003; Chitteti *et al.*, 2010), como la fosfatasa alcalina, la osteopontina, la sialoproteína ósea (Gordon *et al.*, 2007; Chitteti *et al.*, 2010), y la osteocalcina (Gutierrez *et al.*, 2004; Yeung *et al.*, 2002; Chitteti *et al.*, 2010), las cuales juegan un papel importante en la formación de la matriz osteoide y posterior mineralización de la matriz extracelular. Estas proteínas se expresan según la necesidad fisiológica de la formación de nuevo hueso, desarrollando un papel específico en la estructura y formación de la matriz y determinando la calidad del nuevo hueso en formación. Por ejemplo, la sialoproteína ósea se une al colágeno y contribuye a la nucleación de la hidroxiapatita, la osteopontina favorece la adherencia de células y la resorción ósea realizada por los osteoclastos y la osteocalcina es una proteína de unión a calcio íntimamente relacionada con la deposición mineral, que es expresada en las etapas más avanzadas de diferenciación osteoblástica (Wejheden *et al.*, 2006; Lian, 2006).

La constante remodelación del hueso y la variada actividad celular hace que el hueso sea un órgano en equilibrio activo, estos eventos están regulados por la expresión de citosinas, factores de crecimiento y señales las cuales son liberadas por los distintos tipos de células que componen el tejido óseo. Así mismo hueso es un órgano muy frágil que puede sufrir fracturas o lesiones por diferentes traumatismos o enfermedades que generen daño en el tejido, el tratamiento de estos requieren importantes procesos reparativos los cuales dependen de la constante remodelación ósea. Sin embargo, dependiendo el tamaño o la gravedad del traumatismo los procesos regenerativos no son lo suficientemente efectivos para una recuperación completa por lo que debe recurrirse con frecuencia al uso de materiales sustitutos que permitan el remplazo del segmento averiado.

2.2 Ingeniería de Tejidos

El remplazo de tejidos dañados es uno de los temas de investigación mas trabajados actualmente que busca de obtener variadas alternativas que generen soluciones fáciles y exitosas para el remplazo parcial o total del tejido afectado. Se han evaluado ya diversos métodos de acción desde la donación de órganos hasta el uso de implantes, posibilidades con ventajas y desventajas que dependen mucho del daño del tejido a tratar y del método de remplazo, lo cual ha abierto las puertas a la experimentación y búsqueda de mejores tratamientos. La ingeniería de tejidos en pro de estos avances ha desarrollado técnicas donde la calidad de los implantes ha mejorado considerablemente y sus componentes se han asemejado cada vez mas a los naturales generando una mejor integración en el tejido afectado y así obteniendo mejores resultados en el restablecimiento del nuevo tejido y disminuyendo los tiempos de recuperación considerablemente (Estrada *et al.*, 2006).

La ingeniería de tejidos ha sido definida como “la aplicación de los principios biológicos, químicos y de la ingeniería hacia la reparación, restauración, o regeneración de los tejidos usando células, estructuras de soporte y factores de crecimiento solos o de forma combinada” (Kofron *et al.*, 2006) ...“orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos, y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función” (Estrada *et al.*, 2006).

Los implantes mas comúnmente usados son los denominados autólogos (tejido extraído del mismo paciente) que son también muy usados ya que es tejido compatible, viable, no desencadena respuestas secundarias y genera la activación de las células presentes en el lugar de la herida, pero presentan la desventaja de que no puede usarse para heridas de gran tamaño ya que su fuente de obtención es limitada y se requiere una cirugía adicional para obtener el mismo, esto provoca mayor tiempo de recuperación y mayor trauma en el paciente (Kofron *et al.*, 2006; Habibovic *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta esta limitación se recurre entonces a los implantes de tipo alogénicos, (tejido obtenido de un paciente distinto al afectado). Material biológico que si se puede obtener en mayores cantidades pero no mantiene las ventajas del autoinjerto. Este genera una mayor vulnerabilidad a la transmisión de múltiples infecciones y enfermedades, puede generar respuesta inmune por parte del cuerpo hospedero y es susceptible a la posible aparición de callo lo que detendría el proceso de regeneración, en algunos casos retardando la penetración vascular, y limitando el éxito de la reparación del tejido tratado. Además se ha demostrado que los aloinjertos carecen de una activa estimulación de la expresión génica y de factores de crecimiento (Kofron *et al.*, 2006; Habibovic *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2013).

Actualmente se usan en su mayoría implantes metálicos, estos son más económicos y están disponibles en variedad de formas y tamaños para todo tipo de defecto óseo. Estos, aunque representan un buen soporte, están acompañados de reacciones secundarias poco favorables para el paciente como son desgaste del material, daño mecánico en los órganos sanos adyacentes y reacciones alérgicas e inflamatorias por la liberación de partículas y/o iones tóxicos que libera el material (Jaquiéry *et al.*, 2005; Schaefer *et al.*, 2000). Los implantes metálicos solo funcionan como soporte y no generan un efecto activador en la actividad autoregenerativa de las células nativas y por su naturaleza permanecerán implantados a menos de que se realice una nueva intervención para retirarlos generando un nuevo trauma en el paciente. Por esta razón se ha fomentado la investigación para implementar mayoritariamente el uso de los biomateriales, que permitan una mejor interacción entre el implante y el tejido aceptor, buscando inducir a las células nativas a la regeneración y sustitución con tejido propio, considerando al biomaterial como un biosoporte y activador (Schmid, 2002; Estrada *et al.*, 2006; Marcos-Campos *et al.*, 2012).

2.3 Biomateriales

Los biomateriales son denominados como cualquier sustancia de origen natural o sintético o combinación de las mismas, que pueda ser empleada para reemplazar, aumentar o mantener algún órgano o tejido del cuerpo (Ratner *et al.*, 2004; Rosengren, 2004). Esta es un área que está en el auge investigativo actualmente, por lo que se han estudiado gran variedad de materiales con el fin de obtener los mejores resultados pero no todos los evaluados son seleccionados para su aplicación debido a que los requerimientos con que debe cumplir cualquier biomaterial son altamente exigentes. Algunas de estas características son tener una adecuada resistencia mecánica o no ser citotóxicos ni genotóxicos. Finalmente, el principal objetivo es que el biomaterial interactúe con los tejidos adyacentes al implante, esta característica se favorece si el biomaterial alcanza una porosidad mínima que permita el alojamiento de las células, preferiblemente para la regeneración ósea, que estas tengan compromiso osteogénico. Si estos poros se presentan de manera interconectada, además de permitir la invasión celular, favorecerán la comunicación química entre las células y la afinidad molecular del sustrato lo que beneficiaría el desarrollo celular al interior del implante (James *et al.*, 1999; Gleeson *et al.*, 2010). Otro factor importante es la capacidad que tengan los biomateriales para interactuar con las membranas celulares, lo que determina el éxito en la adhesión y activa comportamientos celulares específicos que se activan por señales de activación en la membrana. Esto se ha logrado recubriendo las superficies con moléculas de cargas positivas o neutras y con péptidos cuyas secuencias y estructura sirven como ligando de proteínas de membrana como las integrinas (Novaes Jr. *et al.*, 2010; Saltzman *et al.*, 2007).

El comportamiento de un implante es un evento multifactorial el cual debe ser cuidadosamente regulado ya que esto determinará el éxito en la activación de los procesos reparativos del hueso afectado donde se realizara el implante, además de disminuir los efectos negativos sobre el mismo donde se generan procesos inflamatorios y participa activamente la respuesta inmune. Todos estos parámetros bien regulados establecerán el éxito del implante y la posterior recuperación de la fractura (Hallam, 2002).

Entre los biomateriales que son producto de investigación en la actualidad podemos encontrar los vidrios bioactivos, las cerámicas, los metales porosos y los hidrogeles. La interacción con los tejidos adyacentes dependerá de las propiedades químicas y físicas del material empleado, conformando así un microambiente celular determinado (Ratner *et al.*, 2004; Saltzman *et al.*, 2007; Miyazaki *et al.*, 2013). El éxito de este microambiente esta determinado por tres características básicas del material: el estímulo mecánico, el estímulo electromagnético y la topografía. Estudios recientes demostraron que las propiedades mecánicas de la matriz extracelular inducen la estructura celular y su función regulando la arquitectura del tejido y su organización (Faghihi *et al.*, 2013). Los componentes y su conformación estructural se deben direccionar hacia la inducción de comportamientos celulares específicos que medien la adhesión, la expresión genética y en consecuencia el fenotipo celular, teniendo en cuenta que la respuesta celular esta directamente relacionada a como esta respondería frente a una matriz extracelular natural (Weaver *et al.*, 1997). Por esta razón lo ideal es que los materiales que se utilicen como componentes en los biomateriales para el remplazo óseo deben generar un efecto osteoconductor (que favorecen el crecimiento celular) y osteoinductor (que estimulan a las células a diferenciarse al linaje osteogénico) tanto en las células implantadas como en las células nativas. Además, es importante que estos materiales sean biodegradables para mantener el comportamiento activo del tejido óseo e idealmente, que la velocidad de degradación de estos sea similar a la de formación de nuevo hueso (Eglin *et al.*, 2006).

El reto que enfrenta la ingeniería de tejidos es desarrollar materiales que imiten la arquitectura del hueso y estimulen la deposición de matriz extracelular nueva (Nguyen *et al.*, 2003) y con ellos crear sustitutos que restablezcan y mantengan la función de un tejido dañado, para esto un soporte biológico debe considerar facilitar la localización y la distribución de células específicas en sitios específicos donde se presente el daño, mantener su forma tridimensional que brinde soporte para la formación de nuevo tejido y así guíe su desarrollo para su apropiada funcionalidad y proporcione el ambiente propicio de la matriz para influenciar positivamente en la morfogénesis del nuevo tejido que promueva la regeneración funcional (Lee *et al.*, 2013). Con el propósito de generar matrices

tridimensionales con una mayor porosidad e interconexión de poros y promover la diferenciación de células mesenquimales hacia el linaje osteoblástico se han probado distintos polímeros como el ácido poliláctico, el quitosán, la gelatina, entre otros, (Benoit *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007; Gleeson *et al.*, 2010).

Con estudios mas recientes los biomateriales ya no son solo vistos como una estructura de soporte sino que también debe tener dos propiedades básicas que parecen opuestas pero su balance determina el éxito de estos al momento de la implantación y la recuperación del tejido dañado. La primera es la porosidad que tenga el material, determinante al momento de beneficiar la adhesión celular, inducir la proliferación y favorecer la migración celular induciendo la expresión del fenotipo especializado (Hye-Sun *et al.*, 2012); y la segunda es que aunque sea poroso debe mantener su integridad física y química un tiempo prudente para que las células implantadas sean capaces de realizar los procesos inductivos así como migrar para entrar en contacto con el tejido circundante (Tai *et al.*, 2007).

Los rangos establecidos para la porosidad están en un rango de 100 a 500 μm lo que permite el intercambio de nutrientes y la salida de desechos en condiciones de transporte óptimo. Al mismo tiempo hay que considerar la cinética de la degradación del biomaterial la cual debe ser determinada como una variable critica, esta se comporta de forma inversamente proporcional al rango de porosidad y guarda la proporción según sea la densidad del material (a mayor densidad, mayor tasa de degradación) este comportamiento también depende del tejido que se desee reemplazar y como sea su tasa de regeneración. Para el caso del tejido óseo la velocidad de degradación del material debe ser relativamente baja y debe mantener una fuerza mecánica consistente mientras se realiza el reemplazo del material por la matriz extracelular natural (Ikada, 2006).

2.4 Hidrogeles

Los hidrogeles o polímeros altamente hidratados de origen natural o sintético son clasificados como matrices tridimensionales. Tienen varias aplicaciones como son vehículos para la liberación controlada de sustancias (factores de crecimiento, fármacos, otros), en la fabricación de lentes de contacto o también en la producción de materiales de tercera dimensión (Zhao *et al.*, 2011). Uno de los principales retos ha sido desarrollar hidrogeles con estructura tridimensional que tengan la capacidad de permitir la adherencia y la migración de las células al interior de los poros, con las mismas propiedades funcionales ya mencionadas, especialmente en el cultivo de cartílago y hueso (Bonzani *et al.*, 2006; Dadsetan *et al.*, 2008). Los polímeros mas utilizados para la fabricación de

hidrogeles son el polivinil-metacrilato (Ford *et al.*, 2006; Dalby *et al.*, 2002), el polietilenglicol (Nuttelman *et al.*, 2006), el polivinil-alcohol (Bajpai *et al.*, 2006; (1) Hassan *et al.*, 2000) la poliacrilamida y el colágeno (Lee *et al.*, 2001; Reichert *et al.*, 2009). Estos polímeros tienen la ventaja de que permiten ser modificados por diferentes métodos lo que cambia las propiedades estructurales y actividad de los mismos, una de estas modificaciones es la ventaja de poderlos mezclar con otros materiales como cerámicas como la hidroxiapatita o la posible incorporación de moléculas que facilitan su degradación o facilitan la adherencia y la proliferación celular (péptidos morfogenéticos, otros).

Los hidrogeles son muy atractivos como biomateriales, ya que poseen características que favorecen el desarrollo celular en su interior como su alta permeabilidad al agua, a iones y a moléculas pequeñas; la estructura porosa que favorecería el transporte y la difusión de biomoléculas; además de permitir la adherencia, proliferación e invasión celular y para ensayos *in vivo* la inminente vascularización (Hye-Sun *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013). Dependiendo del polímero estructural utilizado, los hidrogeles pueden ser de baja toxicidad y pueden permitir la inclusión de diferentes péptidos que por ejemplo induzcan adhesión como el RGD (Arg-Gly-Asp), (Raeber *et al.*, 2005; Fittkau *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005), factores de crecimiento, péptidos sensibles a degradación (Lutolf *et al.*, 2003), entre otros.

2.5 Polivinil alcohol

El polivinil-alcohol (PVA) es un polímero producido por la polimerización de vinil acetato a polivinil acetato (PVAc) y la hidrólisis a PVA. La reacción de hidrólisis no es completa y depende de la magnitud de la reacción. El grado de hidrólisis o contenido de grupos acetato en el polímero tienen efecto sobre sus propiedades químicas, solubilidad y cristalinidad, por ello el PVA es un copolímero de PVA y PVAc (Tubbs, 1966 citado por (2) Hassan *et al.*, 2000).

Su atractivo, para variadas aplicaciones, radica en su toxicidad baja, no genera genotoxicidad, ha mostrado buena biocompatibilidad y además posee variadas características que lo hacen atractivo para ensayos biológicos tales como propiedades elásticas determinadas y buena absorción de agua (Wan *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2012). A partir de PVA puede generarse también un hidrogel de estructura elástica (resistente a altas fuerzas mecánicas), estable a los cambios de temperatura y susceptible a la hidratación (Zajackowski *et al.*, 2003; Paradossi *et al.*, 2003). Las características de los hidrogeles de PVA, dependen del peso molecular, concentración del PVA en solución acuosa

y método de síntesis (Stauffer *et al.*, 1992; Ru-yin *et al.*, 2008; Echeverri *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011).

En la literatura pueden encontrarse ejemplos en los cuales los hidrogeles de PVA han sido usados en diferentes campos investigativos como el textil (Thongphud *et al.*, 2008) o para generar sensores (Adhikari *et al.*, 2009), pero sobre todo han sido ampliamente usados en sistemas de suministro de medicamentos ((2) Hassan *et al.*, 2000; Bourke *et al.* 2003; Buttini *et al.*, 2008) e investigaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos (Cho *et al.*, 2005). En esta rama las matrices han sido usadas principalmente para la liberación de proteínas o como soportes para el crecimiento o inmovilización de células (Rosiak *et al.*, 1999; Asran *et al.*, 2010). Se encontró específicamente para los estudios desarrollados con células, que el uso de matrices de PVA modificadas con fibronectina o con finos recubrimientos de hidroxiapatita aparentemente mejoran la adhesión de fibroblastos en matrices de PVA (Zajaczkowski *et al.*, 2003; Nuttelman *et al.*, 2001; Hayami *et al.*, 2006).

En otros estudios el hidrogel de PVA ha sido probado junto con colágeno para la adhesión y proliferación de osteoblastos pero los resultados no han sido concluyentes (Scotchford *et al.*, 1998). El PVA y el colágeno se han usado juntos para la fabricación de biomateriales ya que son de fácil entrecruzamiento por medio del tratamiento dehidrotermal. Este proceso puede deberse a la formación de amidas vía carboxil y amino primarios. Hay que tener en cuenta antes de llevar a cabo el proceso de calentamiento, que el colágeno debe ser correctamente secado ya que se puede causar daño en la estructura helicoidal o incluso hidrólisis cuando el agua residual es muy baja (Yannas *et al.*, 1967 por Scotchford *et al.*, 1998).

En este contexto, el colágeno es una molécula muy atractiva en la fabricación de biomateriales ya que es una de las principales proteínas que conforma la matriz extracelular del tejido óseo y promueve la capacidad de adhesión y proliferación de las células (Gronthos *et al.*, 2001; Hirai *et al.*, 2007; Hye-Sun *et al.*, 2012; Kher *et al.*, 2013). Es importante ya que el colágeno actúa como ligando de las integrinas $\beta 1$ y $\alpha 2$, que son unas de las principales moléculas transmembranales expresadas en los osteoblastos (Gronthos *et al.*, 2001; Hirai *et al.*, 2007; Reichert *et al.*, 2009). Bloquear la integrina $\alpha 2$ con anticuerpos específicos, muestra una reducción sustancial en la expresión de osteocalcina y en la formación de nódulos mineralizados (Xiao *et al.*, 1998). Mientras que la integrina $\beta 1$, por ejemplo, activa la vía de las cinasas de adhesión focal que están

relacionadas con la inducción de fosfatasa alcalina en osteoblastos de modelo humano (Salasznyk *et al.*, 2004).

Otros ensayos donde algunas integrinas fueron bloqueadas con anticuerpos específicos muestran como resultado una menor expresión de marcadores de linaje osteoblástico ya que la unión de estas integrinas a su ligando (fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I, entre otros) es precursora en la activación de vías de señalización que responden a matriz extracelular (Carvalho *et al.*, 2003; Salasznyk *et al.*, 2004). Paralelo a ello, Hirai *et al.*, 2007 han observado que células mesenquimales sobre placas de cultivo recubiertas con colágeno tipo I muestran una mayor activación de la proteína Rho, involucrada en una vía de transducción de señales que responde a la matriz extracelular y cuya inhibición está relacionada con una reducción en la expresión de RANKL, una molécula que se sabe, estimula la actividad osteoclástica.

2.6 Apatita carbonatada (CAp)

Así como incluir colágeno en los biomateriales favorece la adhesión celular, la presencia de cerámicas en los biomateriales compuestos como la Apatita carbonatada (CAp), el fosfato tricalcico o el tetra calcio fosfato, entre otras, representa ventajas para el desarrollo celular ya que el soporte tendrá una mayor similitud con la matriz extracelular natural y por consiguiente las células se desarrollaran de forma mas adecuada y similar a que si lo hicieran en el hueso original. Estos componentes inorgánicos ayudan en su caso a la inducción de las células preosteoblasticas a diferenciarse en osteoblastos maduros, lo que hace atractiva su inclusión en los biomateriales para que funcionen no solo como soporte sino como agentes inductores de la diferenciación celular. Esto es posible ya que variedad de estos componentes inorgánicos ya han sido sintetizados (Fratzl *et al.*, 2007) y su inclusión en soportes para el cultivo de tejido óseo es atractiva en cuanto que los hace más biomiméticos.

La porción inorgánica del hueso está comprendida, principalmente, por hidroxiapatita (algunos de 50 x 25 x 2-4nm en promedio de dimensión). Esta es considerada una cerámica bioactiva por lo cual se convierte en un componente atractivo para la fabricación de biocerámicas que eventualmente serian usadas como sustituto tisular (Asran *et al.*, 2010; Khanarian *et al.*, 2012). Se ha reportado que la hidroxiapatita puede inducir la unión de tejidos adyacentes al implante y favorecer la osteoconducción de los biomateriales, por el contrario se ha encontrado que el efecto osteoinductivo que ejerce la hidroxiapatita sobre las células en el implante y adyacentes al mismo es limitado (Constantz *et al.*, 1999; Currey, 1984; Ducheyne *et al.*, 1999; Levitt *et al.*, 1969).

En comparación, la Apatita Carbonatada (CAp) es un biomaterial de tipo cerámico de composición muy similar a la hidroxiapatita, pero difiere en que posee carbonato dentro del cristal de la cerámica, facilitando la infiltración de diferentes tipos celulares del tejido óseo (Constantz *et al.*, 2002). Teóricamente, la presencia del carbonato en el cristal mejora su reactividad en fluido simulado y su actividad osteoinductiva y osteoconductiva, pero principalmente es superior por su alta capacidad biodegradable frente a la hidroxiapatita (Ducheyne *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2012). Al degradarse CAp, se liberan los iones de calcio y fosfato contenidos, lo que se cree da origen a la bioactividad inducida por el material (Habibovic *et al.*, 2007). Esta cerámica no había sido sintetizada hasta hace poco tiempo, dado que el carbonato introducido en la hidroxiapatita suele perderse durante el horneado de la cerámica (mínimo a 1.000 °C). Se han establecido y patentado dos procedimientos para obtener CAp a través de la reacción en soluciones acuosas (de síntesis húmeda) y por reacción del estado sólido (síntesis seca) previo al horneado en atmósfera controlada. (Jamuna-Thevi *et al.*, 2009; Zakaria *et al.*, 2009) Este nuevo biomaterial de síntesis húmeda para la regeneración de tejido óseo ha sido evaluado, mostrando excelentes resultados en la respuesta *in vitro* con células mesenquimales de periostio (Díaz, 2006; Díaz *et al.*, 2007) e *in vivo* en implantación subcutánea y en remplazo de defectos óseos (Mikán *et al.*, 2009; Zakaria *et al.*, 2009).

El que un biomaterial genere un efecto osteoconductivo en las células y deseablemente un efecto osteoinductivo no es lo único necesario en la fabricación de un hidrogel. Es importante también que permita procesos regenerativos y una rápida recuperación. Por esto los materiales empleados deben tener la capacidad de ser resorbidos por las células específicas y posterior a esto ser remplazados en su totalidad por nuevo hueso producto de la actividad osteoblástica *in situ* por las células nativas del tejido afectado y eventualmente por las células implantadas en el material. Los más atractivos ahora resultan ser los biomateriales compuestos (hidrogel-cerámica) y ya se ha comprobado su potencial de regeneración mediante la activación de tejido nativo, facilitando la integración del implante, aumentando la deposición de nueva matriz y comprobando que las propiedades mecánicas y biomiméticas del soporte son importantes para fomentar la aparición de tejido nuevo funcional (Khanarian *et al.*, 2012). Con respecto a esto, la presencia de carbonato de sodio en el cultivo de osteoclastos se asocia con un incremento en la actividad osteoclastica (Schilling *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el CAp es superior a otras apatitas o fosfatos de calcio como un sustituto de hueso resorbible (Doi *et al.*, 1999; Langstaff *et al.*, 2001).

Se presume que usar CAp en conjunto con de colágeno, y en actividad con las demás características del soporte como la arquitectura de los poros incrementando el área de superficie, la relación

superficie volumen y la rugosidad de la superficie, potencializarían las propiedades del soporte en cuanto a la transmisión de la señalización en la matriz, la actividad celular, la morfología, la adhesión, movilidad y proliferación así como la regulación génica (Faghihi *et al.*, 2013) esperando claramente que se induzca la regeneración natural y se complete el remplazo de tejido óseo. La combinación de cerámica y polímeros como material compuesto, tiene propiedades conjuntas de sus componentes tales como la maleabilidad del polímero y la bioactividad de los fosfatos de calcio.

2.7 Antecedentes

Diferentes grupos de investigación a nivel mundial han buscado la posibilidad de incursionar en la elaboración de biomateriales compuestos para incrementar sus propiedades y mejorar sus componentes, diferentes mezclas de polímeros con proteínas y/o cerámicas han sido evaluados. Principalmente se encontró el trabajo hecho por Degirmenbasi *et al.*, 2006 quienes desarrollan y prueban un hidrogel compuesto por PVA – Colágeno tipo I e Hidroxiapatita, en la caracterización del hidrogel se encontraron buenas propiedades mecánicas y una mejor durabilidad frente a los compuestos de hidroxiapatita y colágeno probados individualmente. Al mismo tiempo, se encontraron limitaciones en cuanto a que al realizar la mezcla de todos los componentes se ve una reducción significativa en la cristalinidad del PVA lo que tiene un efecto en su estabilidad en medio acuoso, la cual se restablece al someter las muestras a un entrecruzamiento criogénico. Se encontró entonces que los componentes pueden ser mezclados obteniendo un hidrogel de estructura porosa (poros de 50 a 500nm de diámetro) con buenas propiedades físicas, pero en este estudio no se comprueba el efecto del hidrogel en un cultivo celular.

Por lo que Villamil, 2009, del grupo de investigación Biotecnología en salud, sintetiza y evalúa un hidrogel compuesto por PVA de bajo peso molecular (30.000 g/mol – 70.000 g/mol) -Colágeno tipo I (Sigma) y CAp. El autor prueba diferentes concentraciones de PVA (5, 7 y 15% (P/V)); ciclos de congelación y descongelación (8, 12 y 16); proporciones PVA:Colágeno I (90:10, 80:20, 70:30) y concentraciones de CAp (0.1, 1, 2.5 y 5%). Villamil, 2009, recomienda la elaboración del hidrogel con 7% de PVA, entrecruzado mediante tratamiento dehidrotermal (vacío -20 mmHg), 8 ciclos de congelación y descongelación, concentración final del 0,8% de Colágeno I y 0,1% de CAp. Al analizar el cultivo de células de médula ósea sobre el hidrogel sugiere su capacidad osteoconductiva y una posible capacidad osteoinductiva. Sin embargo, no se hizo la caracterización del hidrogel y su fabricación aún puede ser optimizada en cuanto a entrecruzamiento PVA, obtención del colágeno, distribución de la CAp en el hidrogel y mejoramiento del tamaño de poro (10- 30µm).

Por otro lado, Song *et al.*, 2012 propone una matriz de PVA- Colágeno tipo I- Hidroxiapatita pero no es propuesto como una matriz tridimensional sino como recubrimiento de placas de cultivo. En este estudio el entrecruzamiento propuesto es por medio de congelación y descongelación y exposición a luz UV. En la caracterización del material se sugiere que el entrecruzamiento por congelación y descongelación aumenta la cristalinidad del hidrogel por consiguiente reduce su tasa de hidratación y disolución en medio acuoso. Además se expone que el material propuesto es atractivo por sus características biomiméticas, y al ser probado con células (línea MC3T3) preosteoblasticas parece tener un efecto osteoconductor y osteoinductor sobre las células evaluadas. Como desventaja presenta que el cultivo solo se evaluó por 11 días, tiempo muy reducido para determinar características de diferenciación osteoblástica.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y buscando mejorar los procesos ya hechos sobre el material compuesto por PVA-Col I-CAp se planteo el desarrollo de este proyecto.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

- Optimizar la síntesis de una matriz tridimensional compuesta de Polivinil-alcohol, Colágeno tipo I y Apatita Carbonatada (PVA-Col I-CAP) con capacidad osteoconductiva.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer el efecto de la concentración de PVA de alto y bajo peso molecular sobre algunas características físicas de hidrogeles de PVA.
- Evaluar el efecto de tratamientos con ciclos de congelación y descongelación y el entrecruzamiento dehidrotermal en la estructura final de hidrogeles de PVA.
- Desarrollar y caracterizar un hidrogel de PVA-Col I-CAP.
- Determinar su capacidad osteoconductiva y posible capacidad osteoinductiva sobre un cultivo primario de células osteoprogenitoras aisladas de médula ósea de porcino.

4. METODOLOGÍA

Los experimentos planteados a continuación se realizaron *in vitro*. Como modelo experimental se usaron células aisladas de médula ósea de porcino (Mikán *et al.*, 2009). El grupo experimental lo conformaron las células cultivadas en hidrogeles de PVA-Col I-CAp y el grupo control del experimento lo conformaron las células cultivadas sobre placas de cultivo. Ambos grupos fueron cultivados en presencia y ausencia de inductores de diferenciación e incubados a 37°C, 5% de CO₂ durante 35 días. Se utilizaron además dos controles adicionales sobre el hidrogel, un cultivo de células de la línea CRL-11372 ATCC pre-osteoblastos humanos los cuales se cultivaron con los inductores en el medio y un cultivo de células Vero Línea CCL81 “American Type Culture Collection” - ATCC que no fueron suplementados con los inductores.

Se establecieron las condiciones para la extracción de colágeno tipo I por medio de la modificación del protocolo propuesto por Gross *et al.*, 1955, y la síntesis de hidrogeles de PVA-Col I-CAp. Se comparó el fenotipo del grupo experimental con el del grupo control. Para ello se evaluó la proliferación celular indirectamente por el medio de la determinación de la actividad hexosaminidasa, la presencia de marcadores transcripcionales asociados con el compromiso de células de linaje osteoblastico por RT-PCR, se analizó la actividad fosfatasa alcalina (D’ippolito *et al.*, 2002; Jaiswal *et al.*, 1997; Manuey *et al.*, 2004) y la formación de la matriz mineralizada a través de nuevos depósitos de calcio producidos por las células en distintos tiempos de experimentación (Carretero, 2009)

4.1 Síntesis de hidrogeles de PVA-Col I-CAp

Para la síntesis del hidrogel de PVA-Col I-CAp, componentes como el PVA y el CAp fueron evaluados por separado, e integrados de la siguiente forma:

Se estandarizó la preparación del hidrogel de PVA iniciando con una solución de concentración final 7% (Villamil, 2009), para esto se probaron distintas combinaciones de PVA de alto (PM: 146.000 – 186.000) y bajo (PM: 30.000 – 70.000) peso molecular disuelta en agua destilada; las proporciones analizadas fueron 3:97, 5:95, 6:94, 8:92 y 10:90 respectivamente. Se analizaron además, 3, 5, y 7 ciclos de congelación a -70°C por 45 minutos y descongelación a 45°C por 15 minutos en baño maría como parte del método de entrecruzamiento y formación del hidrogel de PVA. Finalmente, para evaluar la relevancia del uso del tratamiento dehidrotermal (DHT) un grupo de hidrogeles fue sometido a 130°C por 24 horas y fue comparado con hidrogeles no sometidos a DHT. (Hayami *et al.*, 2006; Scotchford *et al.*, 1998 y Yunoki *et al.*, 2006).

Los criterios de selección de la proporción de alto a bajo peso molecular de PVA a usar en el hidrogel fueron:

- Presencia de poros con tamaño superior a $100\mu\text{m}$ y morfología irregular, los cuales se evaluaron por microscopía óptica (por medio de fotografías que fueron tomadas con la cámara Moticam 2500 5.0MPixel Live resolution-USB 2.0 y analizadas por el software Motic Images Plus 2,0). Se evaluó también volumen de poro.
- Insolubilidad, evaluada por la observación de la consistencia e integridad de los hidrogeles 30 días después de incubación en agua destilada.
- Tasa de absorción, determinada por la medición del peso seco de las muestras y luego el peso húmedo de las mismas después de sumergirlas por 4 horas de en agua.
- Disolución, incubando los hidrogeles en agua por 28 días y monitoreando la cantidad de PVA que pasó a solución, la medición se realizó a las 2, 4, 8 horas y 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días y la lectura fue por absorbancia a 671nm .
- Porcentaje de cristalinidad de los tratamientos por la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido - DSC, variación en la formación de cristales por la técnica de Difracción de Rayos X - XRD y análisis de la variación de sus componentes por el uso de espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier - F-TIR. Estos análisis se contrataron y fueron realizados en la Universidad Nacional de Colombia. El DSC se realizó en la Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Laboratorio de Instrumental. El XRD y el F-TIR se realizaron en la Facultad de Ciencias, Departamento de Física, Laboratorio de Difractometría de Rayos X y Departamento de Química respectivamente.

Luego de seleccionar las condiciones para sintetizar el hidrogel de PVA, se prepararon hidrogeles de PVA + cristales de Apatita Carbonatada (CAp) (tamaño $20\times 60\text{ nm}$, sintetizados previamente por el grupo). Para garantizar que el poro formado en los hidrogeles sea superior a $100\mu\text{m}$ en el proceso de fabricación del hidrogel y después de los ciclos de C/DC las muestras fueron congeladas de forma lenta, por esta razón es necesario que los cristales de apatita estuvieran suspendidos en la solución de PVA por lo menos 24 horas, para esto el CAp se suspendió en citrato de sodio que garantiza una dispersión uniforme de los cristales en el hidrogel, retrasando su precipitación al transcurrir el tiempo (Leeuwenburgh *et al.*, 2010). Se evaluaron distintas concentraciones de citrato de sodio como dispersante (4, 10, 30, 80, 120, 150 mM) así como distintas proporciones de CAp (0.6, 0.8, 1, 1.2%) y se evaluó la combinación óptima a la que los cristales de CAp a una mínima concentración de citrato de sodio se mantenían suspendidos por lo menos por 24h.

Teniendo entonces la concentración a la que se incluiría el CAP se continuó con la inclusión del colágeno. Este fue extraído de piel de feto de bovino por medio de la modificación del protocolo propuesto por Gross *et al.*, 1955, hasta la obtención de un liofilizado.

El colágeno extraído se caracterizó por medio de la evaluación del corrido electroforético (Cliché *et al.*, 2003) e inmunotinción por medio de un Dot Blot utilizando el anticuerpo primario COL1A1(D-13) goat polyclonal IgG (200µg/ml) y el anticuerpo secundario Anti-Goat IgG-Alkaline Phosphatase producido en conejo. Como control positivo para el patrón de corrido y la inmunotinción se realizaron los mismos ensayos con Colágeno Tipo I comercial: Collagen Solution, Ultrapure Bovine. Catalog Number C4243. Sigma-Aldrich. En la solución de trabajo fue disuelto en HCL 0,01M y luego fue expuesto a luz ultravioleta por una hora a 1500 ($\times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) (modificado de Mao *et al.*, 2004), para neutralizar el pH la solución se dializó contra Citrato de Sodio 300mM.

Finalmente; el hidrogel de PVA-Col I-CAP fue obtenido mediante la mezcla entre PVA y CAP sometido a congelación y descongelación, posterior adición del colágeno (concentración final de 0,8% de Col I) y congelamiento lento de la mezcla completa para garantizar que el tamaño de poro fuera del mayor tamaño posible lo cual se logró en un sistema asilado con poliestireno a -20°C por 36 horas. Las muestras se liofilizaron y los hidrogeles resultantes se sometieron al tratamiento DHT y se utilizaron en el cultivo de células de médula ósea de porcino.

4.2 Cultivo primario de células de médula ósea de porcino

Las células osteoprogenitoras se establecieron en cultivo en trabajos previos del grupo de Biotecnología en Salud y se encontraban en un banco de células en nitrógeno líquido. Las células provienen de lavados de médula ósea de huesos largos de cerdo de una semana de vida (de acuerdo a las exigencias de la Ley 84 del 27 de diciembre de 1989 (capítulo VI) del Uso de Animales Vivos en Experimentos e Investigación)

Las células mononucleares previamente aisladas bajo la técnica de Ficoll fueron ampliadas hasta cuarto pase y suspendidas con DMSO y suero fetal bovino. Posterior a esto, fueron congeladas y almacenadas en el banco de células (Díaz *et al.* 2007, Villamil, 2009). Para su reactivación, las células fueron descongeladas y cultivadas en DMEM (medio Eagle's modificado por Dulbecco) y MCDB (Medium complete with trace elements) en proporción 60:40 respectivamente; suplementado con 200mM de glutamina, 2% de suero fetal bovino, 100U/mL de penicilina y 100ug/mL de estreptomycin. Las células se monitorearon para determinar viabilidad y se

mantuvieron hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80% y se usaron para los análisis propuestos a continuación.

4.2.1 Determinación del potencial de osteoconductividad y osteoinductividad de la matriz de PVA-Col I-CAp

Para evaluar el potencial de osteoconductividad y osteoinductividad del hidrogel seleccionado se realizó sobre éste el cultivo primario de las células de la médula ósea de porcino y las células de las líneas ATCC que funcionaran como controles de estabilidad celular y diferenciación teniendo en cuenta los diferentes grupos experimentales planteados y así, se realizaron los análisis respectivos. Los cultivos se realizaron por triplicado en placas de cultivo de 48 pozos (grupo control) o sobre hidrogeles de PVA-Col I-CAp (grupo experimental). Ambos grupos se cultivaron a una densidad de 2×10^4 células/cm² en presencia de 10^{-8} M dexametasona, 50µM L-ascorbato-2-fosfato y 10 mM beta-glicerolfosfato (DiGirolamo *et al.*, 1999) o ausencia de los mismos e incubados a 37°C con 5% de CO₂ durante 35 días.

4.2.1.1. Determinación del potencial de osteoconductividad de la matriz de PVA-Col I-CAp

Los análisis que se realizaron para determinar el potencial osteoinductivo del hidrogel seleccionado fueron: la evaluación de la morfología celular y la determinación de la proliferación celular a través de un método indirecto de coloración.

4.2.1.1.1. Morfología celular

El análisis de la morfología celular en cada grupo se realizó por microscopía óptica sobre las placas de cultivo y sobre el hidrogel se analizaron por cortes histológicos, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina - Eosina y Tricromico de Masson. Para esto, las células sobre el hidrogel se fijaron con glutaraldehído al 3% en PBS pH 7.4 (Buffer Fosfato-Salino, 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄) y posteriormente fueron deshidratadas en concentraciones ascendentes de acetona. También se evaluaron por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se lavaron 3 veces con HBSS y luego se fijaron sumergiendo las muestras en Glutaraldehído al 3% en PBS por 3 horas, luego se retiraron del fijador y se lavaron en PBS nuevamente. Para cada tratamiento las muestras se dividieron en 2 grupos, el primero las muestras se mantuvieron sumergidas en PBS hasta el análisis, mientras que en el segundo grupo las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se realizó un corte transversal para poder analizar los poros internos del

hidrogel, posterior al corte las muestras se incubaron en PBS hasta el análisis. Estos análisis fueron hechos a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo.

4.2.1.1.2. Determinación del número de células

Las células cultivadas se evaluaron a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo. Donde se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células tres veces con HBSS y luego se incubaron por dos horas en una solución de p-nitrophenol-N-acetyl-beta-D-glucosaminido 3.75mM en citrato de sodio 0.05 M pH: 5.0, 2.5% Triton X-100 (Merli *et al.*, 1987). La reacción fue detenida con una solución de glicina 50mM pH: 10.4 y EDTA 5mM. Se midió A_{405} del p-nitrofenol liberado de la reacción en espectrofotómetro (Ultrospect 6300Pro Amersham Biosciences). El cálculo aproximado del número de células de los grupos se determinó indirectamente extrapolando los valores obtenidos en una curva de calibración realizada previamente del p-nitrofenol liberado por actividad hexosaminidasa contra número de células.

4.2.1.2. Determinación del potencial osteoinductivo de la matriz de PVA-Col I-CAP

Los análisis que se realizaron para determinar el potencial osteoinductivo del hidrogel seleccionado fueron la actividad fosfatasa alcalina del cultivo, la formación de nuevos depósitos de calcio sobre la matriz extracelular por medio de la técnica de tinción fluorescente del xilenol orange y la expresión de diferentes marcadores moleculares de la línea osteoblastica por la técnica RT-PCR.

4.2.1.2.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)

La ALP de las células cultivadas se midió por espectrofotometría del p-nitrofenol liberado del sustrato p- nitrofenilfosfato en pH alcalino (D'ippolito *et al.*, 2002; Jaiswal *et al.*, 1997; Manuey *et al.*, 2004), a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo. Los cultivos fueron lavados dos veces con HBSS e incubados durante 20 minutos a 37°C con una solución 2,5 mM de p-nitrofenilfosfato en buffer 50 mM glicina, 1mM $MgCl_2$, pH 10.5. Posteriormente, se adicionó NaOH al 0.2N para detener la reacción. Finalmente, se transfirieron 200 μ L a placas de 96 pozos y el producto de reacción se analizó a 405nm en un lector de ELISA. Para comparar la ALP, los datos de absorbancia obtenidos se analizaron con la ayuda de una curva estándar realizada previamente con datos de ALP conocidos.

4.2.1.2.2. Formación de nódulos mineralizados

La formación de nódulos mineralizados se visualizó por incubación con 35 mg/mL de Xilenol Orange disuelto en medio completo 24 horas antes del análisis (Carretero, 2009),

este parámetro se examinó a los 20 y 35 días de cultivo en las células sembradas sobre la placa y las que se encuentran sobre el hidrogel. Las células se lavaron con abundante HBSS para remover los excesos de colorante no fijado a la matriz y se observó el colorante incorporado en los nuevos cristales de mineral por emisión de color naranja con el uso de microscopia de fluorescencia (Lee *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 1992 y Zarrinkalam *et al.*, 2005).

4.2.1.2.3. Determinación de marcadores moleculares

Se aisló RNA total a partir de las células cultivadas en los días 0, 10, 20 y 35 por el método de trizol (Gibco-BRL Life Technologies). A cada muestra se le removió el medio de cultivo y se lavó dos veces con HBSS. Se le adicionó 500µL de trizol por muestra, se agitó fuertemente y se transfirió cada suspensión a otro tubo y se almacenaron a -70 °C. Al momento de realizar el análisis se descongelaron las muestras, se incubaron a temperatura ambiente por 5 min, luego se les adicionó 0,2 mL de cloroformo por cada mL de trizol y se agitaron fuertemente, se dejaron a temperatura ambiente por 3 min. Después se centrifugaron las muestras a 12000 g por 15 min a 4°C, se transfirió la fase acuosa a otro tubo al cual se le adicionó 0,5 mL de isopropanol por cada mL de Trizol. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 1 mL de etanol al 75% por cada mL de trizol y se homogenizó; posteriormente se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el líquido por no más de 5 min. El precipitado restante se resuspendió en agua libre de RNasas. No se determinó la concentración de RNA total obtenido. El cDNA fue sintetizado utilizando RT-MMLV (Moloney murine leukemia virus, Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorff (AG 22331), para los siguientes marcadores:

- MT1-MMP (producto esperado 480pb):
(5'-CATCAACACTGCCTACGAGA-3' 3'-CCACCTCAATGATGATCACC-5')
- MMP-2 (producto esperado 325pb):
(5'-GAGAGGCTGACATCATGATC-3' 3'-CGTACTTGCCATCCTTGTC-5')
- Osteopontina (OP), (producto esperado 378pb):
(5'-CTGACCCATCTCAGAAGCAG-3' 3'-TAGATTTTGACCTCAGTCCA-)

- Osteocalcina (OC), (producto esperado 249pb):
(5'-TGGCCCTGGCCGCACTTTG-3' 3'-GAAGCGCCGATAGGCCTCCT-5')
- Osteonectina (ON), (producto esperado 388pb):
(5'-AAGCCCTGCCTGATGAGAC-3' 3'-CCCCCTACATAAACGTTCC-5')
- Receptor de la hormona paratiroidea (RHP), (producto esperado 336pb):
(5'-CCAATCAGGGAAGCCCAGGAA-3' 3'-TACGGGTCCGCCAGTTTGTG -5')
- Runx2, (producto esperado 443pb):
(5'-CAGTTCCCAAGCATTTTCATCC-3' 3'-TCAATATGGTCGCCAAACAG-5').

Se utilizaron primers de Beta-actina como control positivo, (producto esperado 305pb):
(5'-TCCCTGTACGCCTCTGGCCG-3' 3'-CAGCTCGTAGCTCTTCTCCA-5').

Los primers utilizados fueron diseñados y estandarizadas las condiciones en trabajos anteriores del grupo en Biotecnología en Salud (Diaz *et al.*, 2007; Carretero *et al.*, 2009; Villamil, 2009) excepto los primers para MT1-MMP, MMP-2 (Manduca *et al.*, 2009) que fueron diseñados con base en la secuencia de los mismos genes en variados mamíferos incluyendo humanos y porcinos disponibles en las bases de datos internacionales utilizando el programa PRIMER (Primer Designer. Version 1.01 1990).

El programa de amplificación empleado fue: un ciclo de 94 °C por 5min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de anillamiento para cada gen por 1 min (β -actina: 60 °C, MT1-MMP: 56°, MMP2: 56° C, ON: 58°C, OP: 63 °C, RHP: 61°C, OC: 61 °C y Runx: 53° C) 72 °C por 1 min, y un ciclo final de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,2% en TAE 0,5x y se corrieron a 73 – 86 voltios en una fuente de poder (marca Thermo EC 105). Las bandas se evidenciaron sumergiendo el gel en Bromuro de Etidio 0,5 [g/mL] por 5 min y lavado con agua posteriormente y la observación se realizó con el analizador de imágenes HITACHI Mod. CCBIO serie: SYD/1537 y el software CCDBIO Gene Snap 4.00.00.

5. RESULTADOS

5.1 Síntesis de hidrogeles de PVA-Col I-CAp

Para la elaboración de la matriz de PVA-Col I-CAp se realizaron inicialmente pruebas por separado y fueron evaluados de la siguiente forma:

Inicialmente se realizaron dos stocks de PVA en agua destilada, uno de alto peso molecular (146.000 – 186.000) y otro de bajo peso molecular (30.000 – 70.000). Para lograr la disolución completa de los reactivos y hacer las soluciones homogéneas, se pesó el polvo del reactivo correspondiente y se adicionó una cantidad de agua cercana al volumen requerido. Las suspensiones se llevaron a autoclave, se dejó 15 minutos a una presión entre 15 a 20 libras, se retiraron y se esperó a que llegaran a temperatura ambiente, para completar los volúmenes de las soluciones stock a la concentración final de 15% (p/v). Con las soluciones listas se hizo la mezcla a partir de los dos stocks y se obtuvieron las soluciones experimentales, todas a una concentración final del 7% (v/v) de PVA en una proporciones de alto y bajo peso molecular según los tratamientos planteados así: 3:97, 5:95, 6:94, 8:97 y 10:90 guardando la proporción de alto y bajo peso molecular respectivamente. Cada solución se sirvió en un sistema de manguera (10cm de largo x 1cm de diámetro) con tapones en sus extremos para obtener los hidrogeles en forma cilíndrica y de allí fueron llevados al proceso de entrecruzamiento en donde el hidrogel fue sometido a 3, 5, y 7 ciclos de congelación a -70°C por 45 minutos y descongelación a 45°C por 15 minutos en baño maría para inducir el entrecruzamiento físico.

Terminados los ciclos respectivos todos los tratamientos se sometieron a una congelación final en la que se deseaba que el proceso ocurriera lentamente para favorecer la formación de poros de mayor tamaño. Para esto los tubos con las soluciones se colocaron en una gradilla dentro de una caja de icopor, dejando amplio espacio entre los tubos, y rellenando este espacio con pequeñas esferas de poliestireno (Figura 21); de esta manera el aire actuó como aislante térmico del frío directo y favoreció que la temperatura bajara lentamente dentro de la caja. La temperatura dentro de la caja fue monitoreada por medio de un termómetro digital al interior de la misma y se comprobó que la temperatura disminuyó de forma lenta, gradual y constante (Anexo 1). Las muestras se dejaron a -20°C por 24 horas.

Pasado el tiempo de la incubación final las muestras fueron sacadas de la caja de icopor y llevadas al congelador de -70°C por 15 minutos y luego liofilizadas. Cuando las muestras estuvieron listas

tenían una textura esponjosa similar al icopor, muy liviana, de color blanco perlado. Su forma fue como se esperaba cilíndrica sin modificaciones ni fracturas, fácil de manejar y de retirar de los cilindros contenedores (Figura 1b). La mitad de las muestras obtenidas fue llevada a horneado para evaluar la relevancia del uso del tratamiento dehidrotermal (DHT) como método para obtener un mejor entrecruzamiento del PVA (Figura 1a) que se trabajó por 24 horas a 130°C en horno con vacío constante.

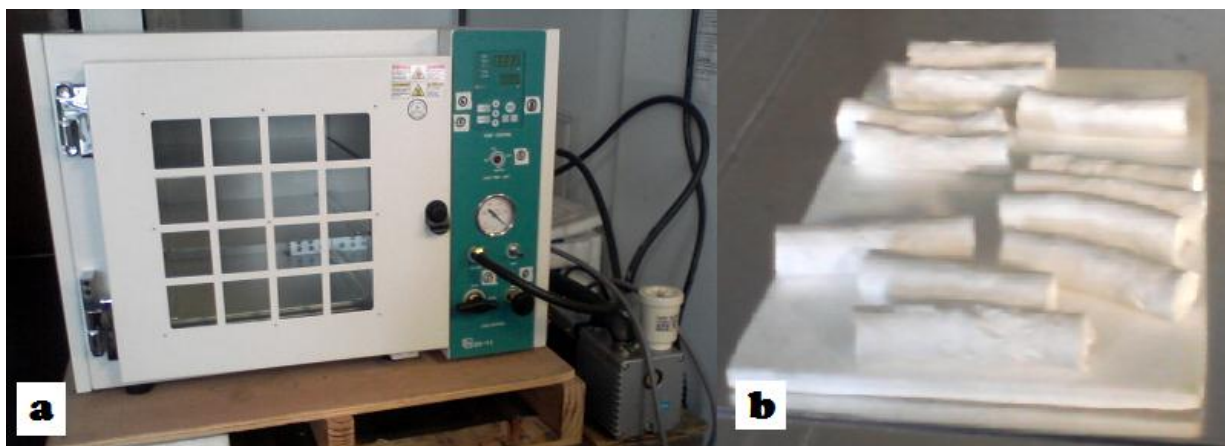


Figura 1: Tratamiento Dehidrotermal. (DHT) (a) Horno usado para el tratamiento DTH Referencia Lab Companion, JEOTECH model OV-11. (b) Hidrogeles de PVA después del proceso de liofilización, listos para iniciar el tratamiento DTH.

El proceso DHT tuvo una duración total de 25.5 horas en total donde las muestras se disponían en el horno, se cerraba y se colocaba el vacío, mientras tanto la temperatura iba subiendo hasta establecerse una hora después. Corrido este tiempo se iniciaba el tiempo de tratamiento de 24 horas en vacío total y a la temperatura planeada. Al finalizar se dejaba ingresar aire a la cámara del horno y se abría la puerta y allí se esperaba media hora a que la temperatura se restableciera y se pudieran retirar las muestras. Terminado el proceso de horneado las muestras mantienen su aspecto inicial con la diferencia de que su color se torna amarillento.

Teniendo ya las muestras listas se procedió a cortar los cilindros a un grosor de 0,5 cm de altura para obtener muestras del tamaño adecuado a los pozos de siembra en las cajas de cultivo. Las porciones correspondientes a los extremos de cada cilindro fueron desechadas y solo se tomaron las porciones mas internas, para hacer las muestras lo mas homogéneas posible. Terminado este proceso, las muestras se dividieron de forma aleatoria para realizar los ensayos planteados para evaluar de cada uno de los tratamientos y así determinar cual es el óptimo para utilizar en la mezcla con la cerámica y el colágeno.

5.1.1. Presencia de poros con tamaño superior a 100µm y morfología irregular:

Para evaluar estos parámetros, las muestras fueron cortadas en un Vibratomo MA 752. Motorised Advanced Vibroslice. Campden Instruments para obtener cortes delgados y uniformes para la evaluación al microscopio y así hacer el análisis de imágenes de los poros de forma correcta. Las muestras fueron cortadas de forma transversal a 80µm de grosor y de forma longitudinal a 90µm de grosor. Se escogió esta medida ya que fue el mínimo espesor al que se pudo cortar las muestras sin que estas perdieran su integridad. Las muestras fueron cortadas según los tratamientos, dispuestas en láminas para microscopio y analizadas por microscopía óptica donde a cada tratamiento se le tomo una fotografía con la cámara Moticam 2500 5.0M Pixel Live resolution-USB 2.0 y analizadas por el software Motic Images Plus 2,0 como se puede ver en la Figura 2 y en el Anexo 2.

Analizando las fotografías se puede determinar que para todos los tratamientos hay presencia de gran cantidad de poros, estos están ubicados de forma aleatoria en la totalidad del área del hidrogel y no son homogéneos ni de forma estrictamente esférica sino parecen ser de forma elipsoide y su disposición es compatible con la de poros interconectados entre si. En todos los tratamientos evaluados se obtuvieron poros con variedad de tamaños, entre estos se encontraron poros del tamaño esperado, 100µm, y se encontraron poros con tamaño superior a los 100 µm y de menor tamaño, estos en una mayor proporción en todos los tratamientos. Al parecer no se ve una diferencia considerable en cuanto a la forma de los poros independientemente del uso del tratamiento DHT, aunque en el caso del tamaño en algunos de los tratamientos estos parecieran disminuir un poco su tamaño con el horneado, como por ejemplo se ve en el tratamiento 6:94 con 5 ciclos de C/DC (Figura 2. Paneles c y d).

También se puede ver que a medida que aumenta la proporción de PVA de alto peso molecular los poros se van haciendo más pequeños aunque estos siguen estando presentes en toda la superficie del hidrogel y estos se distribuyen de forma más ajustada entre ellos mostrando una morfología más alargada y estrecha. También se encontró que a menor número de ciclos de C/DC la porosidad pareciera ser mayor. Sin importar si la muestra es tomada de forma transversal o longitudinal, los poros son visibles y mantienen las mismas características lo que indica que para todos los tratamientos se cumple con la característica de soporte tridimensional.

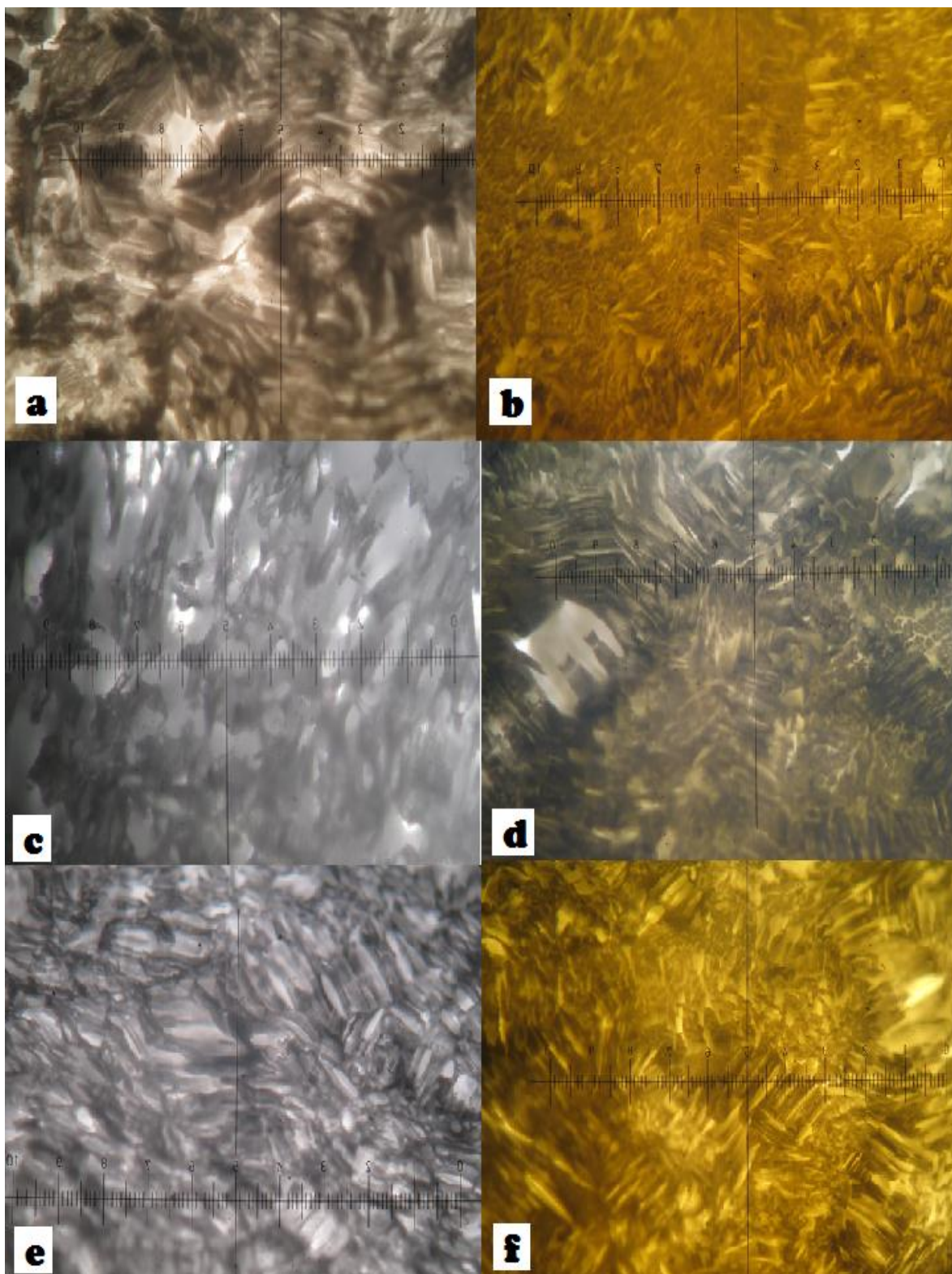


Figura 2: Tamaño y morfología del poro. Hidrogeles de PVA, tratamiento 6:94 (a) 3 ciclos de congelación descongelación (C/DC) Sin tratamiento Dehidrotermal (DHT) (b) 3 ciclos de C/DC Con DHT (c) 5 ciclos de C/DC Sin DHT (d) 5 ciclos de C/DC Con DHT (e) 7 ciclos de C/DC Sin DHT (f) 7 ciclos de C/DC Con DHT. Cada centímetro de la reglilla en la foto corresponde a 500µm.

Para poder tomar una decisión mas acertada sobre que tratamiento utilizar para hacer el hidrogel compuesto con respecto al tamaño y distribución de los poros se realizó un analisis de las áreas de los poros para cada tratamiento. Para esto se usaron los cortes previos, se seleccionaron aleatoriamente 10 placas con distintos cortes (transversal o longitudinal) para cada tratamiento, de cada corte se tomó 1 fotografia de distintos planos al azar con la cámara Motic Image Plus y usando el software de la misma se calculo el área de los poros. Los datos arrojados (Área en micrometros cuadrados vs. Porcentaje de poros) mostraron un rango muy amplio (aproximadamente de 0 a $200.000\mu\text{m}^2$). Se decidio entonces construir rangos de tamaño de poro por intervalos de confianza con la ayuda del programa estadistico SPSS.

Se determinaron tres rangos de diámetro de poro: menor que $160\mu\text{m}$, de 161 a $425\mu\text{m}$ y mayores de $426\mu\text{m}$. Estos rangos se determinaron teniendo en cuenta la proporcion de tamaño de poro obtenido y buscando ubicar claramente el tamaño de poro deseado en todos los tratamientos. Como los datos arrojados son de área (μm^2), se convirtieron estos valores en longitud (μm) para cada grupo. Dado que los poros son de forma elíptica, se sabe que $A = \pi R_1 R_2$ donde $R_1 R_2$ corresponden a los radios menor y mayor, respectivamente (Anexo 3). Para despejar R_2 , quien en últimas corresponde al tamaño de poro, se definio R_1 en términos de R_2 como $R_1 = 2,9R_2$, donde 2.9 corresponde al promedio de la razón R_1/R_2 medida para 80 poros aleatoriamente, y que se tomo como una aproximación a la tasa R_1/R_2 general. Así, la razón del radio de altura y ancho del poro elipsoide quedo como: $A = \pi (2,9 R_2) R_2$; donde $R_2 = \sqrt{[(\text{AREA})/(\pi \times 2,9)]}$. Los datos de diametro ($2R_2$), ahora equivalentes a tamaño de poro, fueron graficados contra frecuencia en cada tratamiento. Esta aproximación se utilizó para evaluar que tratamiento tenia la mayor cantidad de poros del tamaño deseado, esto es, en el rango 161 a $425\mu\text{m}$ (Anexo 3) en comparacion con todos los tratamientos evaluados encontrandose que el tratamiento de proporción de PVA 6:94, con 7 ciclos de C/DC presenta la mayor frecuencia de los poros del tamaño deseado (Figura 3).

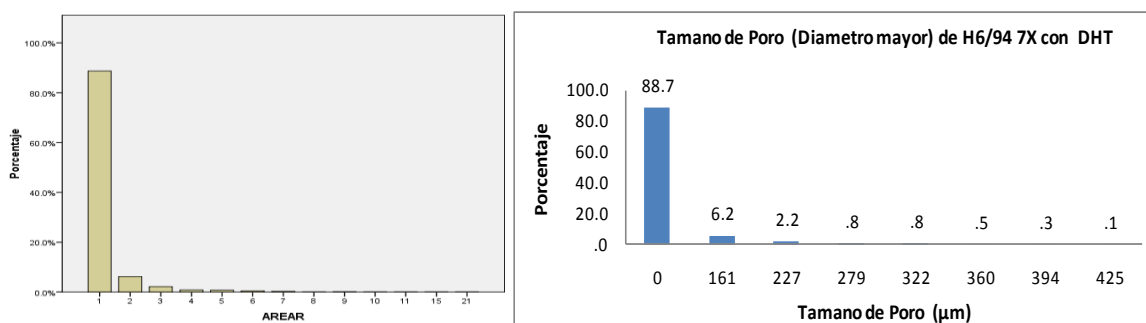


Figura 3. Porcentaje de frecuencia para tamaño de poro. Tamaños de poros obtenidos para el tratamiento PVA 6:94, con 7 ciclos de C/DC y sometido a DHT. (a) Cálculo del área de los poros con Software Motic Image Plus y el programa estadístico SPSS. (b) Tabla de frecuencias para el cálculo “Tamaño de Poro ($2R_2$)”.

5.1.2. Insolubilidad

Como siguiente criterio de selección se evaluó la insolubilidad, esta se determinó por la observación de la consistencia e integridad de los hidrogeles al incubarlos en agua destilada por 28 días.

Se encontró que los hidrogeles que contenían una mayor proporción de PVA de alto peso molecular se mantenían en el tiempo y conservaban más su forma original (Figura 4). Con el paso de los días, los hidrogeles en concentración de 3 y 5 % (v/v) se ven más claros (ya no de un blanco intenso sino empiezan a verse transparentes), observándose burbujas atrapadas en el hidrogel indicando la presencia de poros de gran tamaño en el interior de los mismos y se aprecia con claridad la degradación ya que van reduciendo su volumen con el paso de los días hasta fraccionarse y/o disolverse en su totalidad.

Al sumergir los hidrogeles en el agua lo primero que se observó fue que todas las muestras eran permeables, lo que hizo que se hincharan y su consistencia de icopor se transformo a la de un gel. Seguido a esto se realizó una observación a los 10 minutos donde se evidenció que para las muestras no sometidas al tratamiento DHT en la proporción 3:97 de PVA se habían disuelto en su totalidad; lo mismo sucedió en la proporción 5:95 para las muestras sometidas a 5 ciclos de C/DC, en este tratamiento con el paso del tiempo se puede ver que a menor cantidad de ciclos de C/DC las muestras parecen ser menos estables. En el caso de la proporción 6:96 todas las muestras permanecen pero aquellas tratadas con 5 ciclos de C/DC es evidente la aparición de PVA en solución ya que el agua del pozo se ve más blanca y el tamaño de las muestras se redujo. En la proporción 8:92 el efecto parece ser el contrario, a mayor cantidad de ciclos de C/DC se empiezan a disolver las muestras mas rápidamente, mostrando mayor disolución en las muestras con 5 y 7 ciclos; esta característica se ratifica en las muestras con proporción 10:90 donde las muestras con 7 ciclos de C/DC se disolvieron totalmente. Para el caso de las muestras sometidas al tratamiento DHT a los 10 minutos de incubación no se nota ningún cambio en las muestras sin importar el número de ciclos de C/DC y la proporción del PVA en cada muestra (Anexo 3).

A medida que transcurre el tiempo del ensayo cada mezcla de distintas proporciones de PVA muestra un comportamiento distinto dependiendo de la cantidad de ciclos de C/DC a la que fueron sometidas las muestras y si estas recibieron tratamiento DHT. A continuación se describe el comportamiento de las muestras para los distintos tratamientos a través del tiempo.

Tabla 1. Insolubilidad del PVA proporción 3:97. Comportamiento de las muestras por incubación en agua por 28 días. Muestras tratadas con 3, 5 y 7 ciclos de congelación y descongelación y sometidas o no al tratamiento dehidrotermal.

3:97		
Ciclos C/DC	Sin DHT	Con DHT
	A los 10min todas las muestras habían perdido la forma y se habían fragmentado. A las 8 horas se habían disuelto en su totalidad.	A las 8 horas empezaron a fragmentarse y a los 8 días su consistencia era más frágil y su apariencia transparente. Se disolvieron casi la totalidad de las muestras y las que permanecían lo hacían como una fina capa, similar a una nata sobre el pozo.
En esta proporción de PVA parece no haber relevancia en la cantidad de ciclos de C/DC a los que fueron sometidas las muestras.		

Tabla 2. Insolubilidad del PVA proporción 5:95. Comportamiento de las muestras por incubación en agua por 28 días. Muestras tratadas con 3, 5 y 7 ciclos de congelación y descongelación y sometidas o no al tratamiento dehidrotermal.

5:95		
Ciclos C/DC	Sin DHT	Con DHT
3x	A las 8 horas tenían una forma laminar como una nata	No se disolvieron durante todo el ensayo, pero las muestras redujeron su consistencia adquiriendo apariencia vítrea y encontrándose muchas burbujas en el interior. A los 16 días mantenían dichas características pero aun mantenían la forma cilíndrica, en los siguientes tiempos de análisis las muestras se fragmentaron y disminuyeron el volumen considerablemente
5x	Se disolvieron inmediatamente entraron en contacto con el agua	
7x	Se mantuvieron durante todo el ensayo, se notaba la fragilidad en la consistencia y su tamaño se redujo significativamente.	

Tabla 3. Insolubilidad del PVA proporción 6:94. Comportamiento de las muestras por incubación en agua por 28 días. Muestras tratadas con 3, 5 y 7 ciclos de congelación y descongelación y sometidas o no al tratamiento dehidrotermal.

6:94		
Ciclos C/DC	Sin DHT	Con DHT
	Las muestras se mantuvieron durante todo el ensayo pero se observaron menos consistentes con el tiempo, perdieron volumen y al manipularlas se fraccionaron con facilidad	Las muestras se mantuvieron durante todo el ensayo y es el primer tratamiento donde los hidrogeles mantienen su forma original y se mantienen íntegros hasta finalizar el ensayo
En esta proporción de PVA parece no haber relevancia en la cantidad de ciclos de C/DC a los que fueron sometidas las muestras.		

Tabla 4. Insolubilidad del PVA proporción 8:92. Comportamiento de las muestras por incubación en agua por 28 días. Muestras tratadas con 3, 5 y 7 ciclos de congelación y descongelación y sometidas o no al tratamiento dehidrotermal.

8:92		
Ciclos C/DC	Sin DHT	Con DHT
3x	Las muestras reducen un poco su volumen pero mantienen la forma	Las muestras se mantuvieron durante todo el ensayo, los hidrogeles mantienen su forma original y se mantienen íntegros hasta finalizar el ensayo
5x	Las muestras se disolvieron rápidamente y al final solo se mantiene un pequeño fragmento en cada pozo	
7x		

Tabla 5. Insolubilidad del PVA proporción 10:90. Comportamiento de las muestras por incubación en agua por 28 días. Muestras tratadas con 3, 5 y 7 ciclos de congelación y descongelación y sometidas o no al tratamiento dehidrotermal.

10:90		
Ciclos C/DC	Sin DHT	Con DHT
3x	Las muestras pierden mucho volumen y solo se mantiene un pequeño fragmento al finalizar el ensayo	Todas las muestras se mantengan consistentes hasta el final. De igual forma las muestras se ven más rígidas que las de los tratamientos anteriores
5x		
7x	Se disuelven inmediatamente entran en contacto con el medio acuoso	

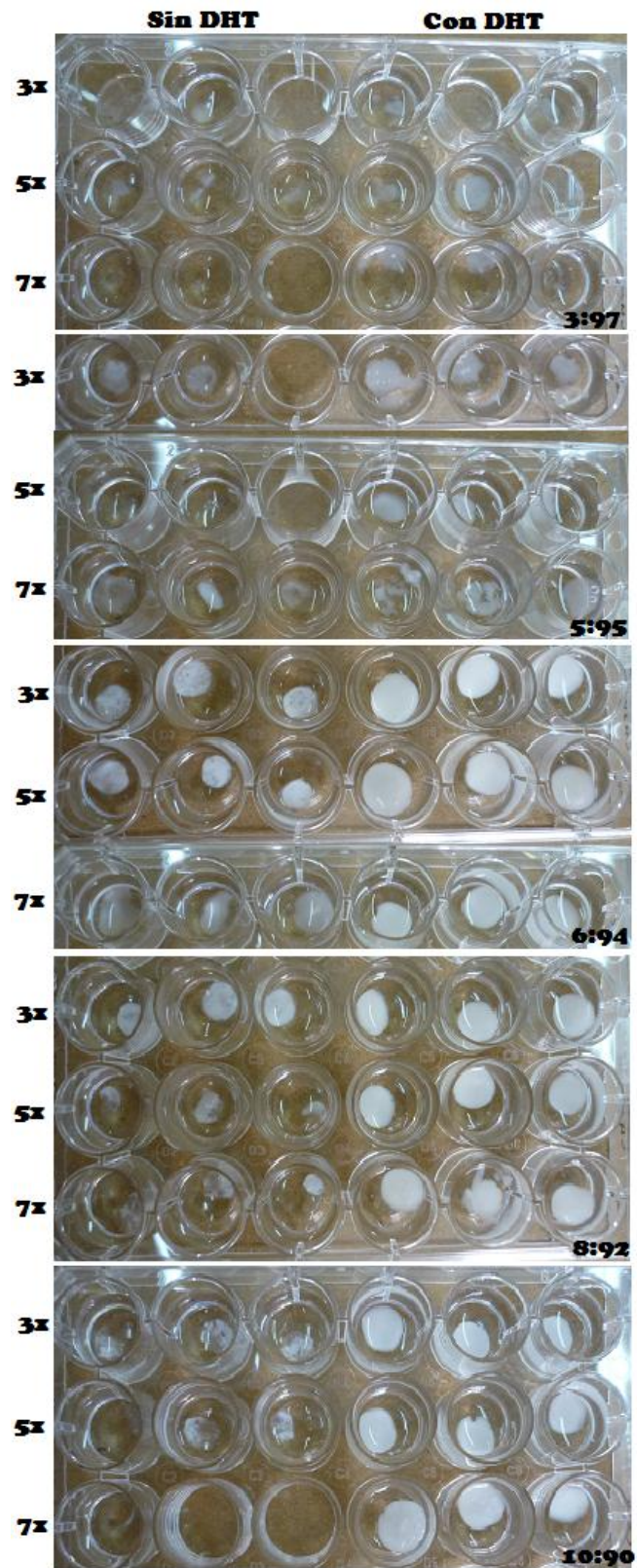


Figura 4. Prueba de insolubilidad. Apariencia de los hidrogeles de PVA con diferentes proporciones de alto y bajo peso molecular, tratados con 3, 5 o 7 ciclos de Congelación/Descongelación sumergidos en agua destilada por 28 días.

Comparando los tratamientos 5:95 y 6:94 para ver la degradación de estos con el tiempo (Figura 5) se comprueba que cuando la muestra evaluada esta compuesta por una mayor proporción de PVA de alto peso molecular el hidrogel resultante es más resistente a la degradación a través del tiempo manteniendo su forma y estructura durante los 28 días de inmersión.

Los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que el someter las muestras a ciclos de C/DC si genera un efecto significativo en la velocidad de disolución de muestras en medio acuoso y esto esta relacionado con la proporción de PVA de alto y bajo peso molecular para cada una. En conclusión, si la muestra tiene una baja proporción de PVA de alto peso molecular, pero es sometida a una mayor cantidad de ciclos de C/DC los hidrogeles obtenidos son más estables en medio acuoso. Al igual que cuando las muestras se tratan con altas proporciones de PVA de alto peso molecular y pocos ciclos de C/DC. Cuando estas variables (proporción de PVA y ciclos de C/DC) se trabajan con valores intermedios, las muestras entran en balance. Se encontró que cuando las muestras cuentan con una proporción igual o superior al 6% de PVA de alto peso molecular y son sometidas al tratamiento DHT, se mantienen estables durante los 28 días de evaluación; visualmente no es posible determinar si los diferentes ciclos de C/DC tienen un efecto sobre la velocidad de disolución, lo que sugiere que para estas proporciones la consistencia depende principalmente de la proporción de PVA evaluado.

En resumen, los resultados obtenidos en este ensayo indicaron que la consistencia de las muestras depende de la relación que hay entre la proporción de PVA y la cantidad de ciclos de C/DC a los que son sometidas las muestras. De igual forma las muestras se ven fuertemente afectadas por el tratamiento DHT que es determinante en la obtención de hidrogeles más estables, donde evidentemente los hidrogeles que no fueron horneados se disolvieron casi en su totalidad al término del periodo estudiado.

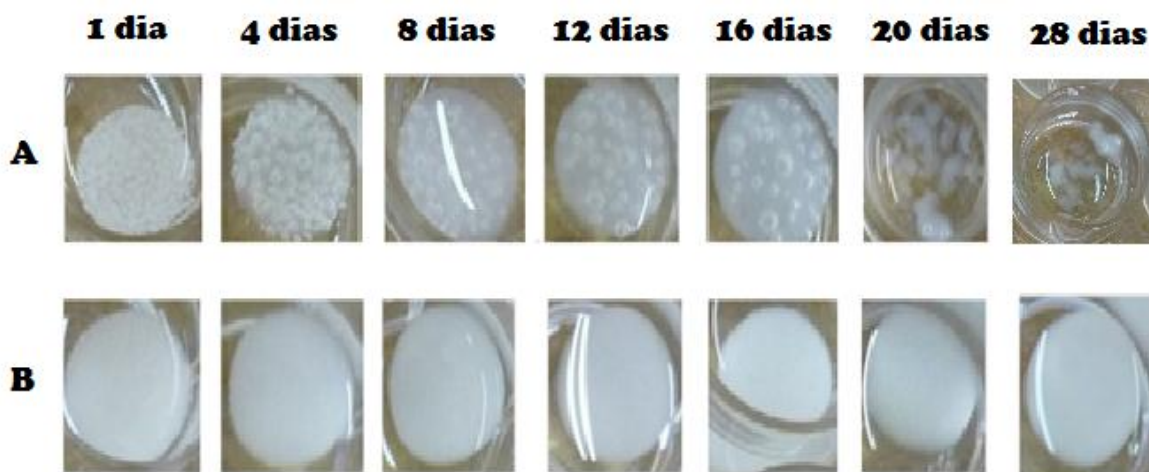


Figura 5. Comparación de la apariencia de hidrogeles de PVA. Hidrogeles preparados con distintas proporciones de PVA de alto y bajo peso molecular, sumergidos en agua destilada comparados a través de 28 días de análisis. (A) Tratamiento 5:95 7 ciclos de C/DC sin tratamiento DHT y (B) Tratamiento 6:94 7 ciclos de C/DC sometido a DHT.

5.1.3. Disolución

El análisis cuantitativo de la disolución se realizó midiendo por absorbancia a 671nm la cantidad de PVA que pasaba a solución cuando los hidrogeles se incubaban en agua destilada en un tiempo determinado. La medición se realizó a las 2, 4, 8 horas y 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días. (Datos de las mediciones Anexo 5). La medición se hizo sobre el mismo pozo para todos los tiempos de análisis el cual se mantenía con un volumen constante de 1,5mL de agua por pozo, el volumen en cada pozo con el tiempo y por efecto de la incubación disminuía, para lo que antes de cada toma de muestra el volumen total de cada pozo se media y se igualaba al volumen estándar planteado, con esto se corrigió el efecto de concentración de soluto por evaporación del solvente. Para hacer la medición de absorbancia por triplicado, se tomo en cada tiempo 1mL de cada pozo y se midió en el espectrofotómetro W/Visible SPECTROPHOTOMETER ULTROSPEC 6300pro Amer Sham Bioscience.

En los ensayos de disolución se encontró que las muestras que no son sometidas a DHT se disuelven con facilidad, mientras que visualmente el efecto no es claro para las muestras con DHT, en términos de la variable número de ciclos de C/DC. Se evaluó entonces esta variable en los tratamientos sometidos a DHT de forma cuantitativa y se encontró que la tasa de disolución se ve

afectada por esta después de 200 horas de evaluación. Las absorbancias obtenidas fueron convertidas a fracciones disueltas con respecto al total de la muestra (en porcentaje) para graficar los datos obtenidos. Para una misma proporción de PVA sometida a diferentes ciclos de C/DC (Figura 6), en las primeras horas de inmersión de los hidrogeles no hay diferencias significativas y para todos los ciclos la fracción disuelta de la muestra aumenta rápidamente. A las 50 horas aproximadamente la tasa de disolución disminuye hasta hacerse casi constante y pasadas las 200 horas se evidencian diferencias significativas entre los tratamientos donde a una mayor cantidad de ciclos menor porcentaje de la muestra disuelta. En la figura 6 se muestra específicamente el tratamiento 5:95 pero el patrón es el mismo para todas las distintas proporciones de PVA evaluadas.

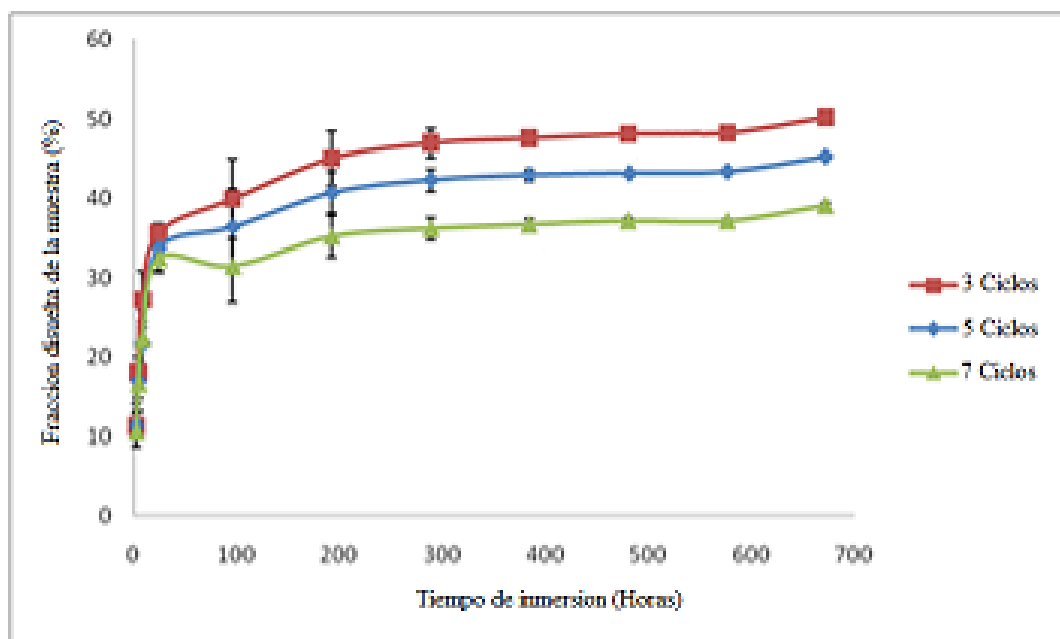


Figura 6. Efecto de los ciclos de C/DC en la disolución. Fracciones solubles de hidrogeles de PVA en al proporción 5:95 de alto y bajo peso molecular para diferentes ciclos de C/CD a través del tiempo. Las barras indican ± 2 desviaciones estándar a partir del promedio.

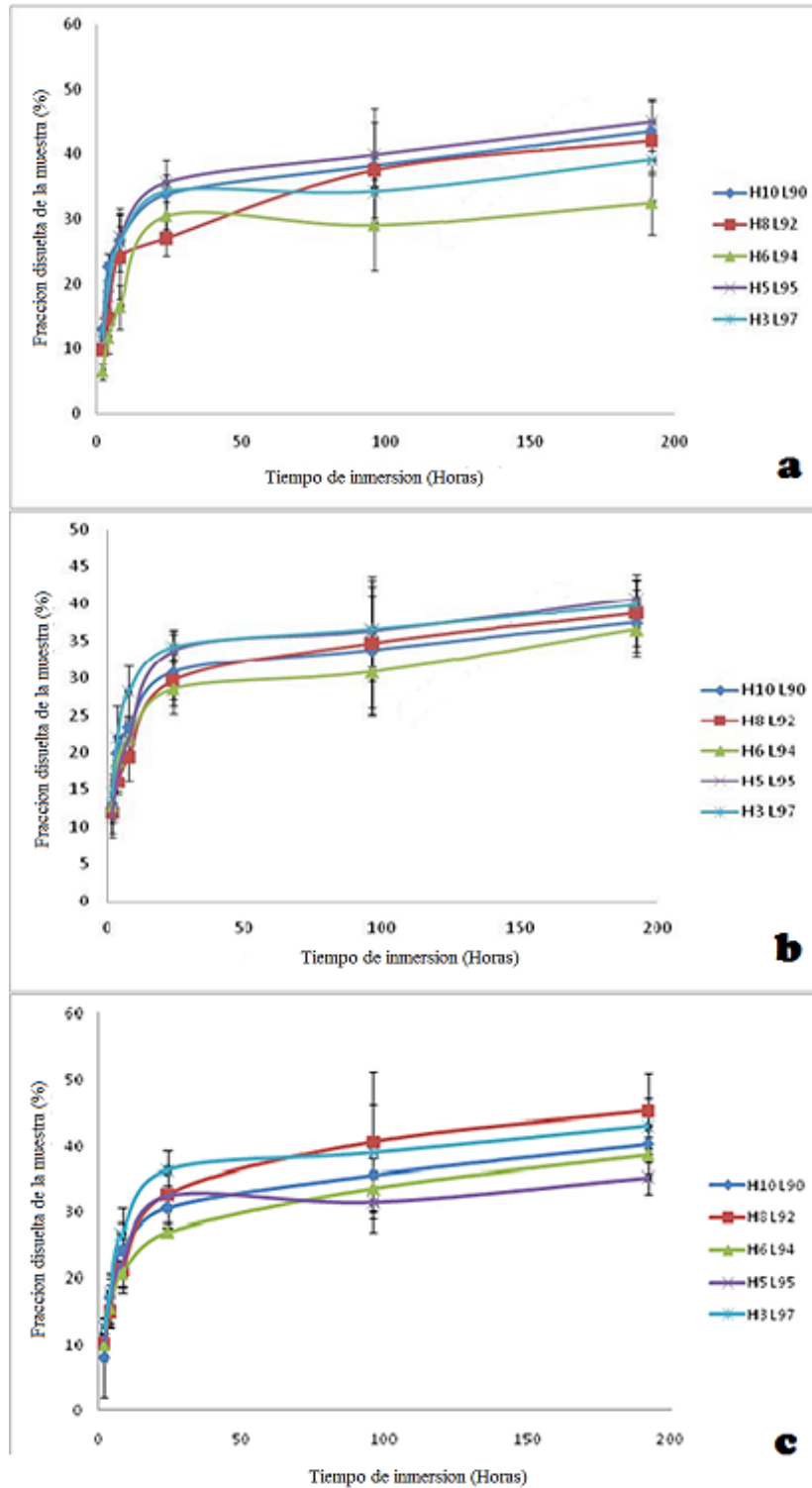


Figura 7. Efecto de los ciclos de la proporción de PVA en la disolución. Fracciones disueltas de hidrogeles de PVA en diferentes proporciones de alto y bajo peso molecular a través del tiempo después de (a) 3 ciclos de C/CD (b) 5 ciclos de C/CD (c) 7 ciclos de C/CD. Las barras indican ± 2 desviaciones estándar a partir del promedio.

También se evaluó si utilizar una proporción distinta de PVA altera la tasa de disolución en las muestras, independiente del ciclo de C/DC y se encontró que para los diferentes tratamientos de PVA evaluados, no hay diferencias significativas en las fracciones disueltas de muestra a través del tiempo, cuando todas estas son tratadas bajo la misma cantidad de ciclos de C/DC. Como se puede ver en la Figura 7, las graficas son similares, independiente del ciclo evaluado, sin diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los tres ciclos evaluados, donde las fracciones disueltas están alrededor del 25 al 45% en todos los tratamientos. En el patrón de disolución encontramos que las primeras 24 horas, la disolución de las muestras ocurre rápidamente. Después de 12 días de inmersión, la disolución se hace más lenta y casi estable.

5.1.4. Tasa de absorción y volumen de poro

Para calcular el radio de absorción, se tomó el peso seco de todas las muestras según los tratamientos y luego estas se colocaron en placas de 24 pozos y se sumergieron en 1.5mL de agua, se incubaron a 37°C por un lapso de 4 horas, seguido de lo cual se tomo nuevamente el peso de todas las muestras. Se manejaron tres replicas por tratamiento.

Para los tratamientos sin DHT se tomaron todos los pesos secos iniciales pero no fue posible tomar los datos después de la hidratación ya que las muestras o se disolvieron en su totalidad, o no tenían la consistencia necesaria para ser manipuladas sin que se deshicieran, imposibilitando realizar el correspondiente pesaje. Así que este análisis se realizó solo con las muestras que se trataron con DHT (ver datos obtenidos en el Anexo 6). Con estos datos se calculo la tasa de hidratación con la siguiente formula:

$Q = (m - m_0) / m_0$ Donde m_0 corresponde al peso seco de la muestra y m al peso de la muestra después de determinado tiempo en agua.

Con estos datos se pudo calcular la tasa de hidratación para los hidrogeles en cada uno de los tratamientos, los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1 y se compilan en la Figura 8. Se puede ver que la tasa de hidratación entre peso seco y peso húmedo de cada uno de los tratamientos evaluados se incrementó en relación al aumento de la proporción de PVA de alto peso molecular en los hidrogeles hasta la proporción 6:94, luego de este tratamiento los valores de Q se empiezan a reducir nuevamente a medida que se incrementa la proporción de PVA de alto peso molecular. También se encontró que no hay diferencias significativas para el valor de Q obtenido cuando se comparan los diferentes ciclos de C/DC en las proporciones 5:95 y 8:92. Para la proporción 10:90

se encontró diferencia significativa para las muestras tratadas con 3 ciclos de C/DC donde la tasa de hidratación se reduce, en cambio para la proporción 6:94 hay diferencias significativas entre los datos obtenidos en los ciclos 3 y 5 frente a los obtenidos en 7 ciclos donde el Q calculado es menor. De igual forma el hidrogel correspondiente a este tratamiento parece presentar la mayor de toma de líquido frente a las demás proporciones de PVA.

Tabla 6. Datos de la tasa de hidratación. Hidrogeles de PVA en distintas proporciones sometidos a hidratación por 4 horas en agua.

HMW wt%	Ciclo 3x		Ciclo 5x		Ciclo 7x	
	Con DHT	S.D.	Con DHT	S.D.	Con DHT	S.D.
3					4,96	0,24
5	6,21	0,34	5,94	0,39	5,84	0,32
6	7,93	0,27	8,61	0,94	7,05	0,14
8	5,71	0,1	6,08	0,19	6,03	0,19
10	5,49	0,15	6,32	0,51	6,82	0,7

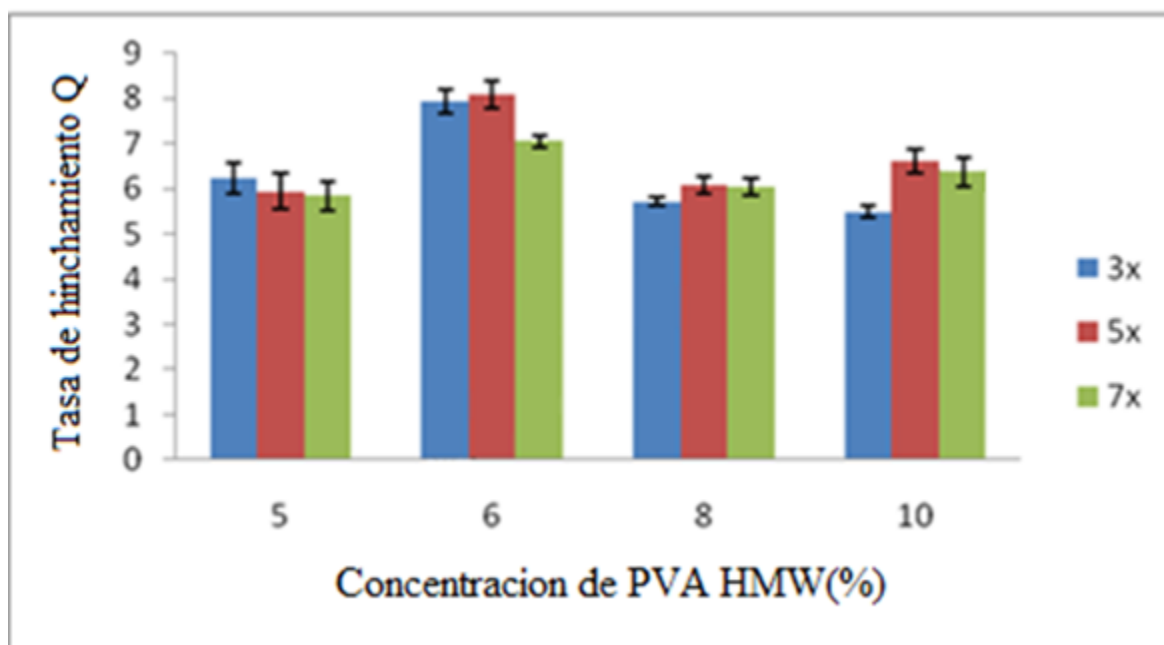


Figura 8: Tasa de hidratación Q. Hidrogeles de PVA en distintas proporciones, tratados con diferentes ciclos de C/DC después de hidratación por 4 horas en agua. Se presenta barras de error para cada punto con la desviación estándar a partir del promedio.

Luego se procedió a calcular el porcentaje de porosidad de los hidrogeles a las muestras que fueron sometidos al tratamiento DHT. Para calcular el porcentaje de porosidad se utilizo la ecuación:

$$\text{Porosidad} = \text{Volumen del poro } (\pi) / \text{volumen total de la masa}$$

Los datos obtenidos muestran que el volumen de poros o π no se ven influenciado por los ciclos C/DC y al parecer tampoco por la proporción de PVA de alto peso molecular en las muestras (Tabla 2). Esto concuerda con las fotografías tomadas donde se observó que los poros disminuyen en tamaño pero así mismo aumentan en cantidad. Para todos los tratamientos el volumen de poros encontrado es mayor al 85% lo que es muy favorable mientras la muestra no se disuelva con facilidad.

Tabla 7. Porcentaje de porosidad. Análisis de los hidrogeles de PVA en diferentes proporciones de alto y bajo peso molecular (HMW/LMW). Volumen de poro total (π) de hidrogeles de PVA de variada proporción y diferentes 3, 5 y 7 ciclos de congelación y descongelación (C/DC). SD corresponde a la desviación estándar.

CICLOS C/DC			3 X		5 X		7 X	
PVA	HMW (VOL%)	LMW (VOL%)	π (vol %)	SD	π (vol %)	SD	π (vol %)	SD
	3	97	88.74	1.44	87.62	0.80	87.73	1.02
	5	95	88.24	1.24	88.14	2.13	85.71	1.52
	6	94	89.21	0.03	90.61	1.18	90.27	1.15
	8	92	88.79	1.33	88.65	1.01	90.32	1.70
	10	90	89.34	1.23	89.66	0.68	87.14	0.43

5.1.5. Difracción de Rayos X (XRD)

Para evaluar la variación en la formación de cristales se realizó XRD a muestras de los diferentes tratamientos. Los datos obtenidos mostraron que en los tratamientos evaluados para diferentes proporciones de PVA, para un solo tratamiento de C/DC, los hidrogeles mantienen un patrón característico independiente de la proporción de PVA. Se encontró que, para todos los tratamientos se puede ver el mismo pico principal consistente a 2θ en 19.5° , el cual se observa en todos los tratamientos de diferentes proporciones de PVA. Este va aumentando en intensidad a medida que la proporción de PVA de alto peso molecular aumenta hasta el tratamiento 8:92 y en el tratamiento 10:90 disminuye nuevamente. En la Figura 9 se ve este efecto en el caso de las muestras sometidas a 5 ciclos de C/DC pero el patrón se repite en las muestras con 3 ciclos y 7 ciclos.

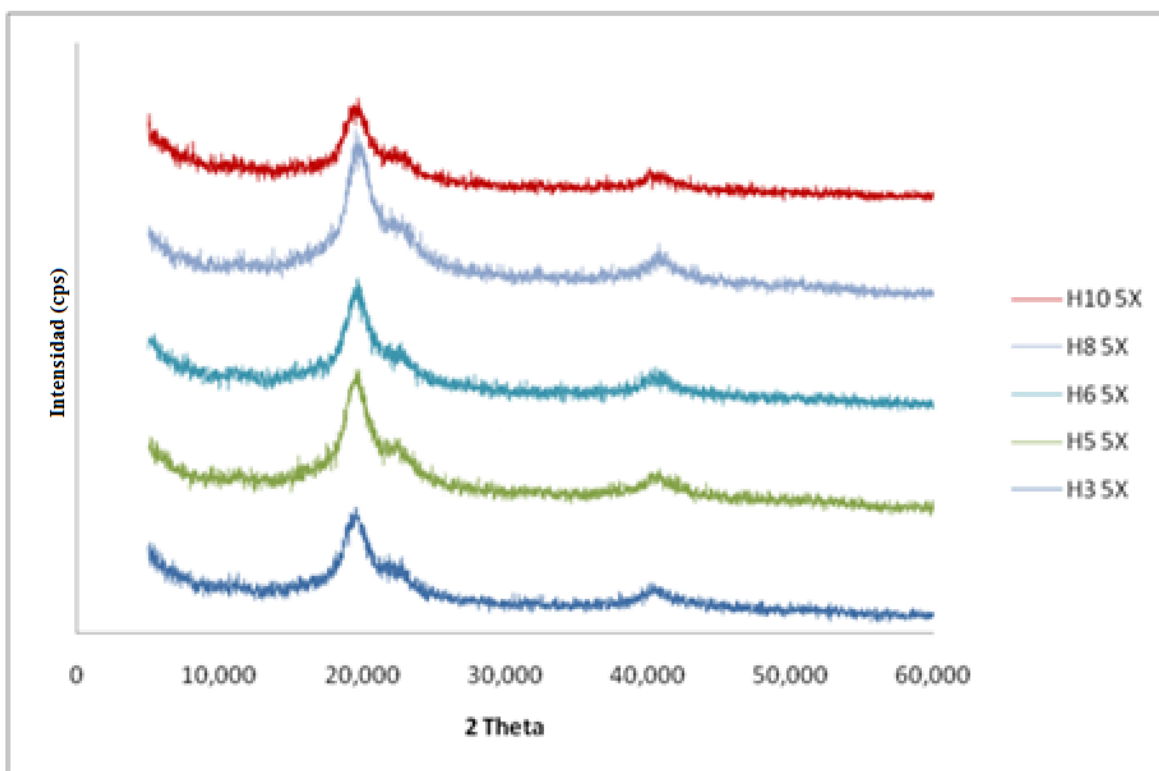


Figura 9. Efecto de la proporción de PVA evaluado por XRD. Patrón para los tratamientos en la disolución para hidrogeles de diferentes proporciones de PVA de alto y bajo peso molecular (HMW/LMW), después de 5 ciclos de C/DC. Se determina la intensidad en ciclos por segundo (cps) del rayo en un ángulo de observación 2θ .

En cuanto al efecto que tiene los ciclos C/DC en los diferentes tratamientos de PVA se puede observar que a medida que se aumenta el número de ciclos el pico principal del PVA se hace más ancho en el rango mencionado a 2θ de 19.5° y los datos de intensidad aumentan a medida que los ciclos de C/DC aumentan mostrando una relación proporcional, esto hace que el pico principal se vea más agudo, esta característica pareciera no afectar los demás picos presentes en el patrón. Como se puede ver a continuación en la Figura 10 que corresponde a las muestras del tratamiento 6:94 en proporción de alto y bajo peso molecular respectivamente ejemplifica lo dicho anteriormente. Al evaluar las diferentes proporciones de PVA se encontró que el patrón mostrado en esta grafica es consistente con las demás proporciones lo que indica que sin importar la proporción de PVA evaluado los ciclos de C/DC tienen el mismo efecto sobre las muestras evaluadas.

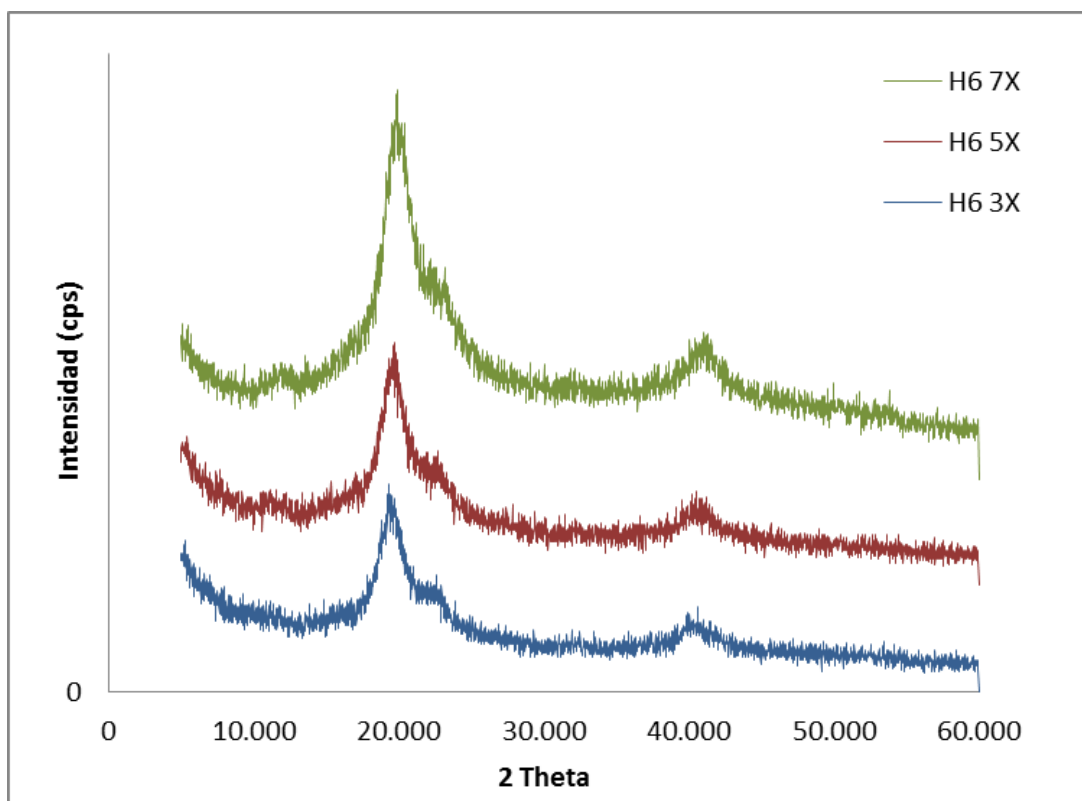


Figura 10. Efecto de los ciclos de C/DC evaluado por XRD. Patrón para los hidrogeles correspondientes a la proporción 6:94 de PVA de alto y bajo peso molecular los cuales fueron sometidos a 3, 5 y 7 ciclos de C/DC. Se determina la intensidad en ciclos por segundo (cps) del rayo en un ángulo de observación 2θ .

5.1.6. Espectro Infrarrojo con Transformación de Fourier FTIR

Para hacer el análisis de la variación de los componentes se analizaron todas las proporciones y tratamientos de los hidrogeles de PVA previamente propuestos. Los datos obtenidos revelan la presencia de picos a 3300 cm^{-1} (*stretching of -OH*), un pico a 2924 cm^{-1} (*asymmetric stretching of CH₂*), un pico a 1721 cm^{-1} (*stretching CO*), un pico a 1427 cm^{-1} (*O-H, C-H bending*), un pico a 1373 cm^{-1} (*CH₂ wagging*), un pico a 1250 cm^{-1} (*C-O-C*), otro a 1088 cm^{-1} (*stretching CC*) y bending OH que se determina como la secuencia amorfa del PV), un pico a 933 cm^{-1} (*bending CH₂*) y otro a 826 cm^{-1} (*rocking CH₂*).

Cuando se evaluó el efecto que tenía tratar las muestras con diferentes ciclos de C/DC sobre el mismo tratamiento de PVA se encontró que los picos a 3300 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} y 1088 cm^{-1} disminuyen su tamaño a medida que aumentan los ciclos de C/DC y al mismo tiempo se evidencia un aumento en la intensidad de los picos a 1721 cm^{-1} y 1250 cm^{-1} relacionado con el mismo aumento en los ciclos de C/DC. Esto evidencia que los ciclos de C/DC a los que son sometidos las

muestras si tienen un efecto en la restructuración molecular de las muestras alterando la vibración de las moléculas y los enlaces que componen, como se evidencia en la Figura 11 donde se analizó los datos para el tratamiento 3:97 con diferentes ciclos de C/DC. Para todos los tratamientos de PVA el efecto es el mismo así que independiente de la proporción de PVA evaluado los ciclos de C/DC modificarán las muestras evaluadas.

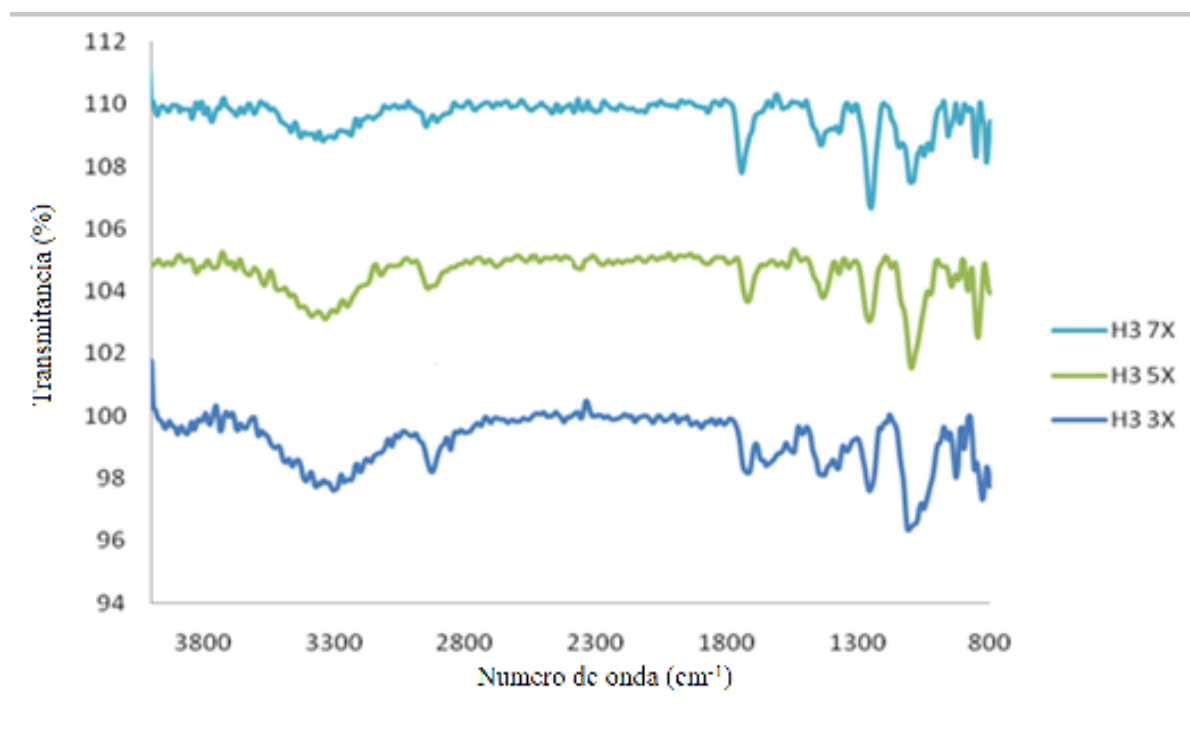


Figura 11. Efecto de los ciclos C/DC evaluado por FTIR. Espectro para los hidrogeles del tratamiento 3:97 obtenidos por la mezcla de las correspondientes proporciones de PVA de alto y bajo peso molecular después de se sometidas a 3, 5 y 7 ciclos de C/DC. Se evalúa la transmitancia (%) obtenida para cada pico ubicado en un número de onda característico.

Por el contrario al evaluar los tratamientos donde varía la proporción de PVA no se ven cambios significativos en el patrón de los picos del espectro, corroborando lo que se encontró en el resultado anterior. Esto es evidente en la Figura 12 donde al observar los distintos patrones para muestras tratadas con los mismos ciclos de C/DC (3 ciclos, en este caso) pero con diferentes proporciones de PVA, los picos que se obtiene para todas las muestras están ubicados en el mismo rango de número de onda y parecen tener la misma intensidad de transmitancia, con muy pocas variaciones y donde los picos principales se mantienen. Haciendo pensar que no hay modificación en las estructuras para esta variable evaluada.

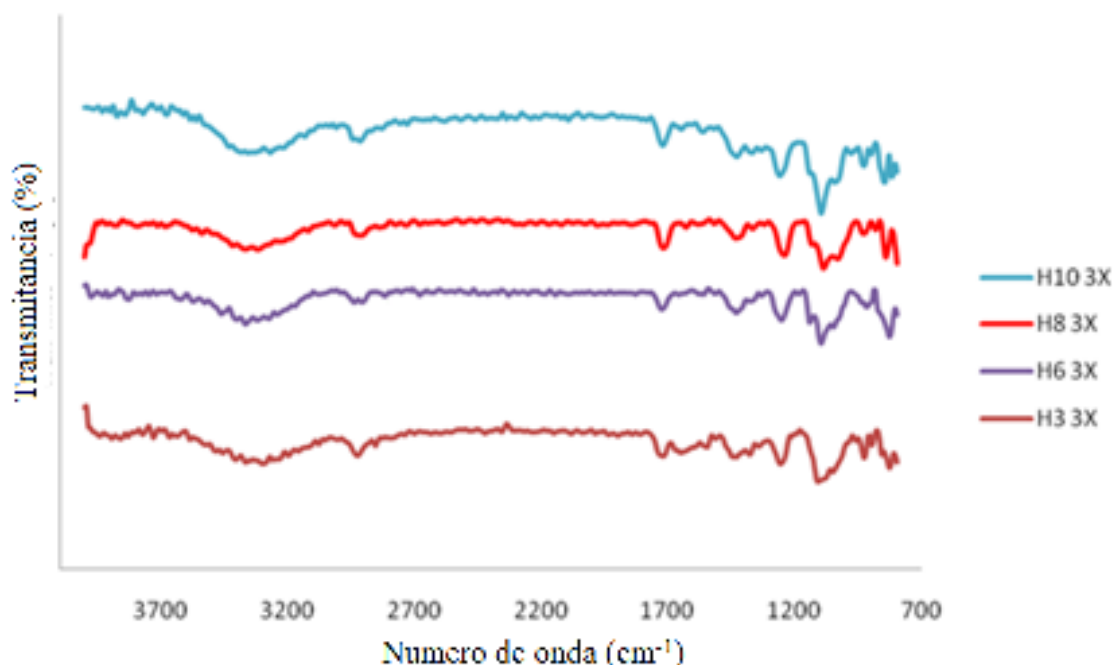


Figura 12. Efecto de la proporción de PVA evaluado por FTIR. Espectro para los hidrogeles de diferentes proporciones de PVA de alto y bajo peso molecular (HMW/LMW) los cuales fueron tratados con 3 ciclos de C/DC. Se evalúa la transmitancia (%) obtenida para cada pico ubicado en un número de onda característico.

5.1.7. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Para terminar estos análisis básicos de los hidrogeles de PVA se realizaron los termogramas de DSC. Con estos se logró identificar las variaciones en el porcentaje de cristalinidad del PVA dependiendo de los diferentes tratamientos evaluados. Inicialmente los resultados obtenidos mostraron que para todas las proporciones evaluadas de PVA y todos los tratamientos evaluados de C/DC se generan en las muestras un patrón de picos endotérmicos, cuyo valor varía dependiendo el tratamiento.

Los datos detallados de cristalinidad se muestran en la Tabla 3. Allí se encontró que los valores obtenidos para la temperatura de transición vítrea (T_g), los cuales parecieran no variar considerablemente dependiendo de la proporción de PVA evaluado pero siempre se ve que el valor es mayor para las muestras que fueron sometidos a pocos ciclos de C/DC y el valor de la temperatura va disminuyendo un poco a medida que los ciclos van aumentando. Para los valores de la temperatura de fusión (T_m) se pudo ver que, por el contrario, no parecen afectados ni por los ciclos de C/DC ni por las diferentes proporciones de PVA evaluadas, como ocurre con los valores la temperatura de cristalización (T_c). Los valores correspondientes al calor de la fusión de la muestra

obtenidos (ΔH_f , dada en joule por gramo) variaron considerablemente mostrando que a medida que aumenta la proporción de PVA de alto peso molecular el valor aumenta hasta un pico en la proporción 6:94 y luego los valores se reducen nuevamente; la tendencia a aumentar el valor también se ve relacionada al aumento en el número de ciclos de C/DC a baja concentración de PVA de alto peso molecular (proporción 3:97) el cambio es menor a 1, ya en la siguiente proporción en los tratamientos con 5 y 7 ciclos de congelación y descongelación los valores son cercanos a 2 y en la proporción 6:94 los valores varían entre 2 y 6 aproximadamente, en las proporciones siguientes los valores vuelven a un rango entre 1 y 2. Este comportamiento se ve reflejado en el dato de porcentaje de cristalinidad de la muestra (% X) donde el mayor valor se obtiene para el tratamiento 6:94 con 7 ciclos de C/DC.

Tabla 8. Datos de análisis DSC. Hidrogeles de diferentes proporciones obtenidos por la mezcla de PVA de alto y bajo peso molecular y tratados con diferentes ciclos de C/DC. Donde T_g corresponde a la temperatura de transición vítrea, T_m corresponde a la temperatura de fusión, T_c corresponde a la temperatura de cristalización, ΔH_f corresponde al calor de la fusión de la muestra, dada en joule por gramo y % X es el porcentaje de cristalinidad de la muestra.

MUESTRA	T_g (°C)	T_m (°C)	T_c (°C)	ΔH_f (J/g)	(% X)
PVA H3 3X CON	76.61	214.81	210.99	0.97	0.70
PVA H3 5X CON	75.77	213.58	210.26	0.87	0.63
PVA H5 3X CON	81.35	206.59	205.49	0.13	0.09
PVA H5 5X CON	74.68	213.89	209.83	1.74	1.26
PVA H5 7X CON	75.51	213.66	209.62	2.09	1.51
PVA H6 3X CON	80.21	216.64	211.42	2.46	1.77
PVA H6 5X CON	78.40	215.62	210.60	4.33	3.12
PVA H6 7X CON	75.27	215.79	210.11	6.49	4.68
PVA H8 3X CON	76.83	214.76	210.29	1.05	0.76
PVA H8 7X CON	75.46	213.72	209.26	2.41	1.74
PVA H10 3X CON	77.10	215.87	211.17	2.30	1.66
PVA H10 5X CON	75.42	214.87	210.45	0.91	0.66

Al analizar las graficas correspondientes a los valores obtenidos se puede decir que cuando el polímero cuenta con un mayor grado de cristalinidad los picos obtenidos son relativamente más estrechos. Se puede ver también con claridad la característica de que a medida que se incrementan los ciclos de C/DC se aumenta la cristalinidad de las muestras en algunos tratamientos. La gráfica a continuación muestra el tratamiento que obtuvo los datos más elevados en cuanto a porcentaje de cristalinidad, el tratamiento 6:94 (Figura 13) se puede ver como la cristalinidad se incrementa de 1.77% en el ciclo 3x, a 3.12 % en el ciclo 5x y finalmente a 4.68% en el ciclo 7x.

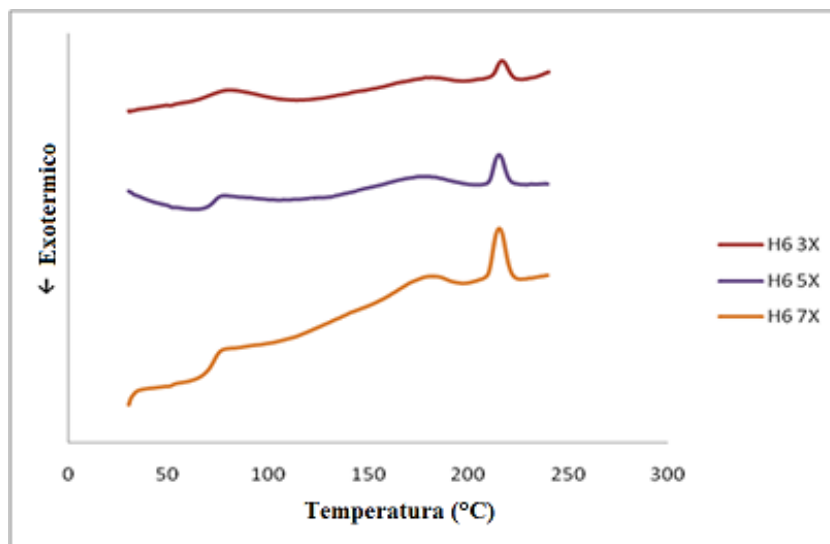


Figura 13. Efecto de los ciclos C/DC evaluado por DSC. Termograma para el tratamiento 6:94 de PVA después de 3, 5 y 7 ciclos de C/DC. Se muestra para cada tratamiento las transiciones térmicas del hidrogel (y) cuando son sometidas a variaciones de temperatura en grados centígrados (x).

El incremento de la cristalinidad que iba en relación directamente proporcional al aumento de los ciclos de C/DC como se vio en la gráfica anterior, no es recurrente en todas las diferentes proporciones de PVA evaluadas, sobre todo cuando se aumenta la proporción de PVA de alto peso molecular en las muestras. Como se puede observar en la Figura 14, donde se ven los datos obtenidos para el tratamiento 8:92.

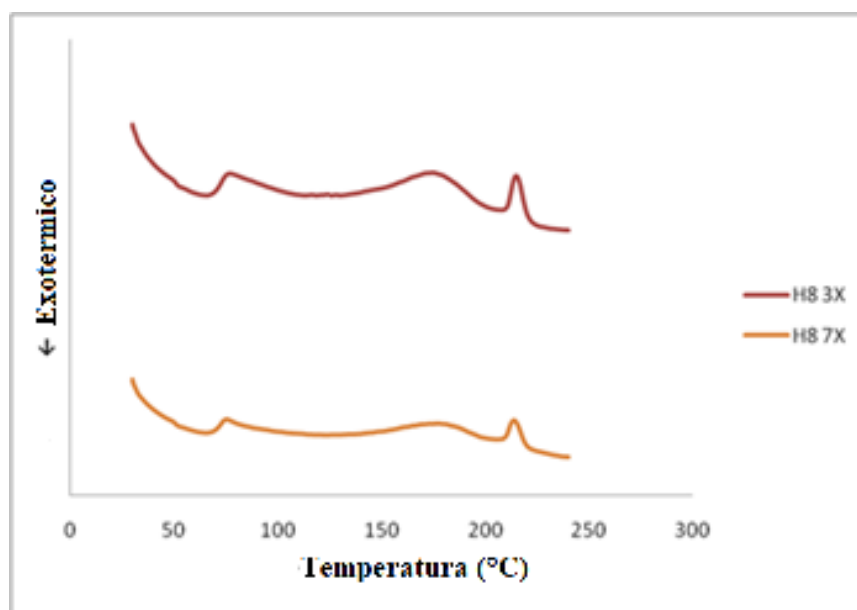


Figura 14. Efecto de los ciclos C/DC evaluado por DSC. Termograma para el tratamiento 8:92 de PVA después de 3 y 7 ciclos de C/DC. Se muestra para cada tratamiento las transiciones térmicas del hidrogel (y) cuando son sometidas a variaciones de temperatura en grados centígrados (x).

Al comparar la relación de PVA de alto y bajo peso molecular en cada muestra encontramos que al incrementarse la concentración de PVA de alto peso molecular incrementa también el grado de cristalinidad hasta el tratamiento 8:90 y luego la cristalinidad disminuye nuevamente para el tratamiento 10:90 como se puede ver en la Figura 15 (a) para las muestras sometidas a 3 ciclos de C/DC. El mismo patrón se pudo ver para las muestras sometidas a 5 ciclos de ciclos C/DC, donde se puede ver un aumento en la cristalinidad a medida que la proporción de PVA de alto peso molecular va en aumento hasta antes del tratamiento 10:90 donde la cristalinidad se reduce nuevamente (Figura 15 (b)).

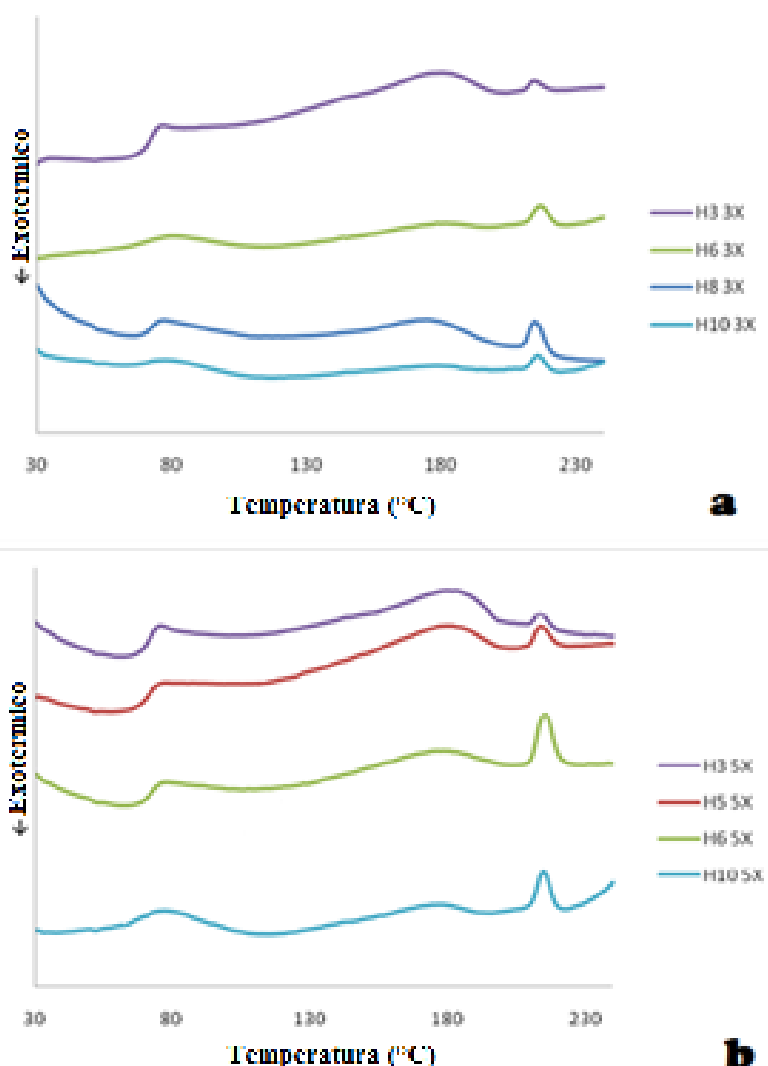


Figura 15. Efecto de las proporciones de PVA evaluado por DSC. Termograma de hidrogeles obtenidos por la mezcla de diferentes proporciones de PVA de alto y bajo peso molecular, tratados con el mismo número de ciclos de C/DC. (a) 3 ciclos de C/DC (b) 5 ciclos de C/DC. Se muestra para cada tratamiento las transiciones térmicas del hidrogel (y) cuando son sometidas a variaciones de temperatura en grados centígrados (x).

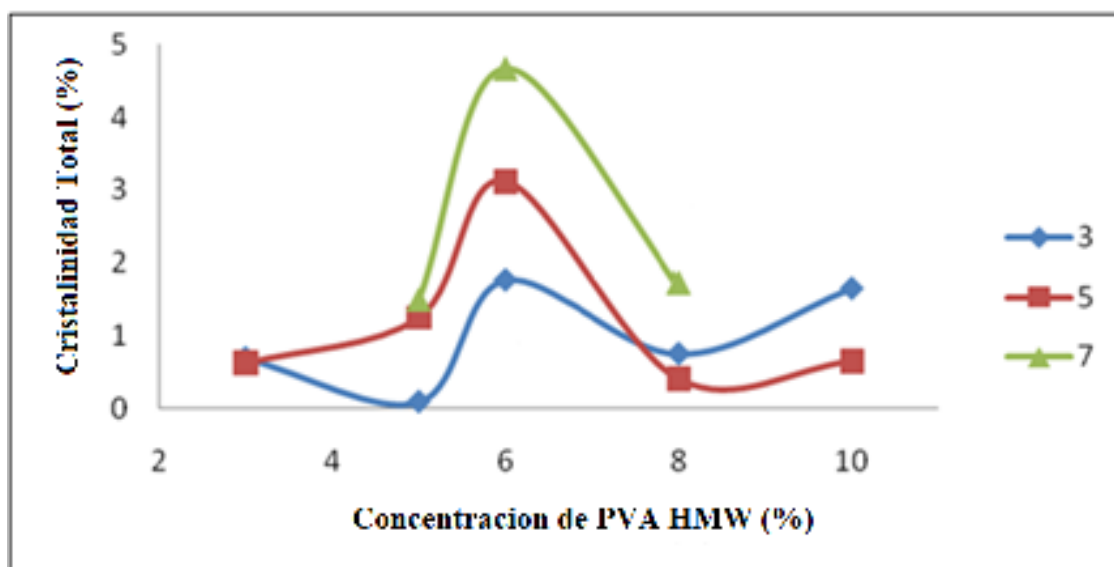


Figura 16. Porcentaje de cristalinidad. Cambio de la cristalinidad en los hidrogeles según el tratamiento a 3, 5 y 7 ciclos de C/DC y la proporción de PVA alto y bajo peso molecular.

Analizando la cristalinidad total para cada proporción de PVA sometida a diferentes ciclos de C/DC, como se puede ver en la Figura 16, se encontró que a una proporción media de PVA (ejemplo tratamiento 6:94), se encuentra siempre el mayor porcentaje de cristalinidad y este va en aumento a medida que los ciclos de C/DC aumentan.

El tamaño de los cristales se calculó con la ecuación de *Scherrer* $\tau = (K \lambda) / (\beta \cos\theta)$ Donde τ es el tamaño medio de los dominios (cristalino) ordenados, K es un factor de forma adimensional, con un valor próximo a la unidad, λ es la longitud de onda de rayos X, β es la línea de la ampliación de la mitad de la intensidad máxima después de restar la ampliación de la línea instrumental, en radianes y θ es el ángulo de Bragg. Los datos obtenidos se graficaron y se muestran en la Figura 17.

Se observa que según el número de ciclos de C/DC aplicados a los tratamientos se genera variación en el tamaño de los cristales. Para el tratamiento 3 ciclos de C/DC, el tamaño de cristal se reduce con el aumento en la proporción de PVA de alto peso molecular alcanzando su punto mínimo en el tratamiento 6:94 y en los tratamientos siguientes donde la proporción sigue en aumento se observa un incremento del tamaño del cristal. Cuando son tratadas con 5 ciclos de C/DC el tamaño de los cristales no parece variar con diferentes proporciones de PVA de alto y bajo peso molecular y para los tratados con 7 ciclos de C/DC el comportamiento es inversamente proporcional al visto en los tratados con 3 ciclos, aumento en el tamaño de los cristales a medida que aumenta la proporción de

PVA de alto y bajo peso molecular hasta el tratamiento 6:94 y luego una reducción en el tamaño hasta el tratamiento 8:92.

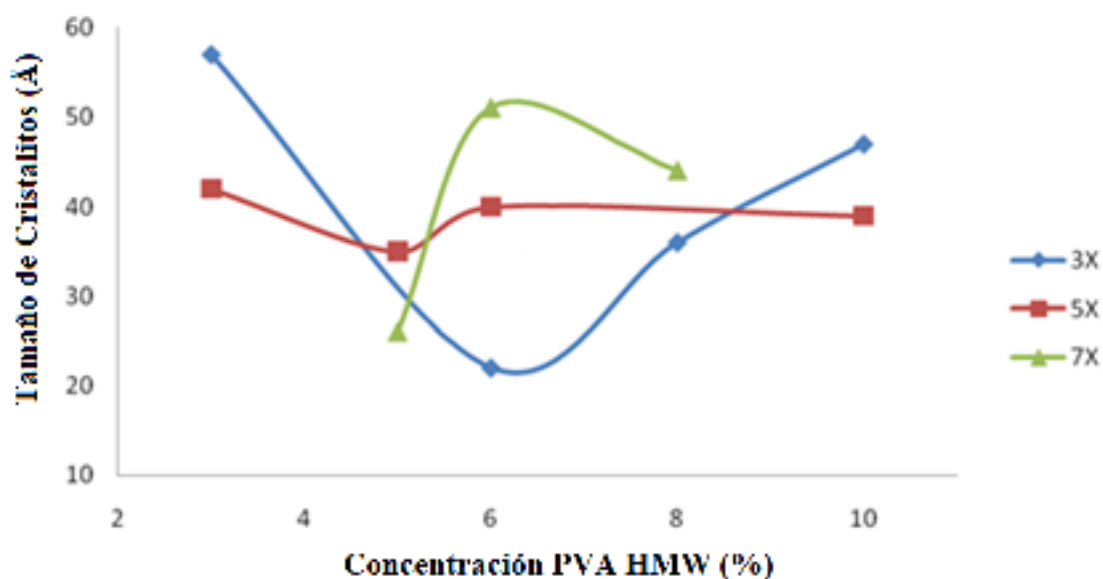


Figura 17. Tamaño de los cristales. Obtenido para los hidrogeles respecto de 3, 5 y 7 ciclos de C/DC, según la proporción de PVA de alto y bajo peso molecular para cada muestra. Se analiza el tamaño de los cristales en armstrong (Å) contra los diferentes tratamientos de PVA en diferentes proporciones.

5.1.8. Polivinil alcohol - Apatita Carbonatada (CAp).

Basados en los resultados obtenidos en los experimentos de disolución y el comportamiento de los hidrogeles de PVA de alto y bajo peso molecular en proporción 6:94, considerando el volumen de poro de los mismos, que se notó entre los más altos del estudio, se escogió esta proporción para preparar el compuesto de PVA-Colágeno-CAp y con 7 ciclos C/DC puesto que se observó una buena hidratación con este tratamiento. Teniendo esta selección en cuenta se procedió entonces a preparar los hidrogeles de PVA + cristales de Apatita Carbonatada (CAp).

Lo primero que se realizó fue asegurar que el CAp se mantenga suspendido en la solución de PVA por un tiempo suficiente para que no se precipitara durante la congelación lenta de las suspensiones PVA-Col I-CAp. El citrato de sodio ya ha sido utilizado en previos estudios como ayudante para mantener partículas en suspensión (Leeuwenburgh *et al.*, 2010), por esto se probó en distintas concentraciones (4, 10, 30, 80, 120, 150 mM) conjuntamente con distintas proporciones de CAp (0.6, 0.8, 1, 1.2) para encontrar la combinación óptima a la que los cristales de CAp a una mínima concentración de citrato de sodio se mantenían suspendidos homogéneamente por lo menos por 24h. En el proceso se encontró que si las partículas de CAp estas bien disgregadas el tiempo en que

permanecen suspendidas es mayor. Para esto todas las mezclas a evaluar se sonicaron por 35 minutos y luego se agitaron por 3 horas. Se encontró que para todas las distintas concentraciones de citrato de sodio el CAp se mantiene suspendido por menos algún tiempo, este depende de la concentración evaluada, comprobando la capacidad del citrato para suspender la cerámica. La velocidad de precipitación se vio de forma consecuente con el aumento de la concentración del CAp en la suspensión, es decir, que a medida que este aumentaba en proporción su precipitación era más acelerada; pero también a medida que el citrato de sodio aumentaba en concentración el CAp permanecía suspendido por más tiempo.

Aun así para la concentración más baja de citrato de sodio evaluada (4mM) el tiempo de suspensión del CAp fue mayor a 24 horas cuando la proporción de CAp era hasta el 0,6%. A proporciones mayores de CAp se presentaba precipitado a las 24 horas, el cual aumentaba de tamaño a medida que la proporción de CAp aumentaba en la muestra. Por consiguiente y como el objetivo era encontrar la menor concentración de citrato de sodio que soportara la mayor cantidad de CAp suspendido por 24 horas, se decidió que este sería el tratamiento ideal para utilizar en el protocolo de preparación. En conclusión, los datos obtenidos sugieren que el CAp se puede agregar al 0,6% para el hidrogel compuesto y este se suspenderá en citrato de sodio al 4mM.

5.1.9 Colágeno

Teniendo entonces la concentración a la que se incluiría el CAp se realizaron las pruebas para la inclusión del colágeno, el cual fue extraído de piel de feto de bovino, según el protocolo modificado en el laboratorio a partir del propuesto por Gross *et al.*, 1955 (Anexo 7). Así, se obtuvo un liofilizado, que fue disuelto en HCL 0,01M y expuesto a luz ultravioleta por una hora a 1500 ($\times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) para su completa disolución (modificado de Mao *et al.*, 2004). Terminado este proceso la solución de colágeno obtenida fue homogénea y de color café claro, como se puede ver en la Figura 18. Para las pruebas de caracterización también se preparo una solución de Colágeno Tipo I comercial (Collagen Solution, Ultrapure Bovine. Catalog Number C4243. Sigma-Aldrich) que se uso como control positivo. Este reactivo se disolvió de la misma forma, presentando características semejantes a la solución de colágeno extraído, excepto que su color era blanco perlado (Figura 18).

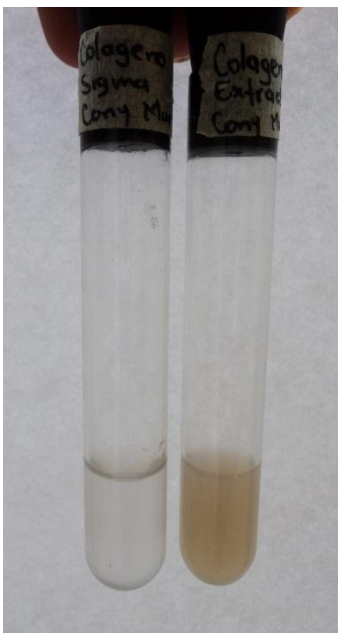


Figura 18. Soluciones de Colágeno. Izquierda: Colágeno Tipo I Collagen Solution, Ultrapure Bovine. Catalog Number C4243. Sigma-Aldrich. Derecha: Colágeno extraído de piel de fetos de bovino en el laboratorio.

Dado que para alcanzar la solubilidad completa del colágeno es necesario utilizar una solución ácida, esta debe ser neutralizada antes de suspender en ella la cerámica, pues el pH ácido disuelve CAP. Por consiguiente, la solución de colágeno se dializó contra Citrato de Sodio 300mM por 3 días. Una vez equilibrado el colágeno está listo para mezclar en el hidrogel compuesto en donde quedará a una concentración de final de 0,8% (Villamil, 2009). La realización de este proceso no cambia la consistencia ya descrita de la solución.

A continuación, se realizó la cuantificación de colágeno en estas las soluciones por el método de Bradford (Anexo 8). La medición se hizo a partir de una solución de Colágeno al 2,4% que corresponde a la solución que se usará para hacer los hidrogeles compuestos finales y 0,8% para el colágeno sigma que será la concentración final de colágeno en el hidrogel (Villamil, 2009). Los datos obtenidos son una concentración de $0,187\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el colágeno extraído y $0,102\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el colágeno comercial.

Teniendo estos valores se procedió a realizar el corrido electroforético para comparar los patrones de corrido para los dos colágenos (Protocolo Anexo 9), obteniendo patrones de corrido muy similares para las dos soluciones de colágeno. Esto indicaría que el colágeno extraído es por consiguiente Colágeno tipo I (Figura 19 (Carriles 3 y 4)).

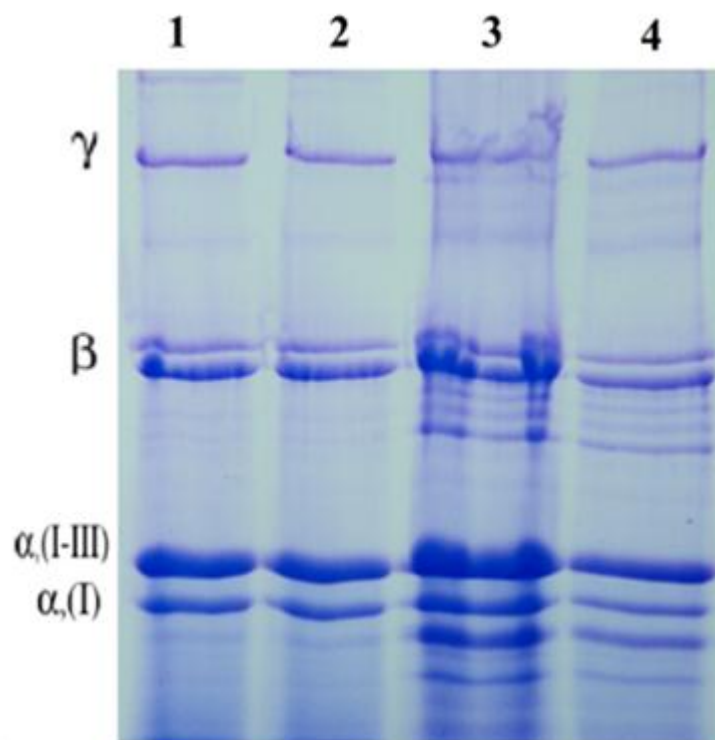


Figura 19. Corrido electroforético Colágeno. Corrido electroforético de las proteínas de colágeno extraído y comercial. Carriles 1 y 2: control positivo colágeno tipo I Sigma. Carriles 2 y 3: colágeno extraído en el laboratorio a partir de piel de feto de bovino. γ : Trímeros de colágeno (220 kDa), β : dímeros de colágeno (205 kDa) y α : monómeros de colágeno (130-116 kDa).

La inmunotinción por medio de un Dot Blot (Protocolo Anexo 10) reveló con claridad que la reacción se da tanto en el control positivo como en la muestra extraída, soportando que el colágeno extraído por el método propuesto corresponde a Colágeno tipo I (Figura 20).

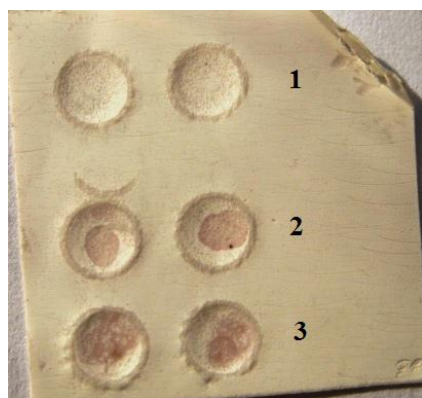


Figura 20: Dot Blot Colágeno. Análisis de las soluciones de colágeno extraído y comercial. Reacción en membrana de PVDF con anticuerpo primario COL1A1(D-13) goat polyclonal IgG (200 μ g/ml) en dilución 1:200 y anticuerpo secundario Anti-Goat IgG-Alkaline Phosphatase producido en conejo A4187 en dilución 1:30.000. Sustrato de revelado BCIP/NBT (Tabletas Sigma B5655). Fila 1: Blanco de reacción. Fila 2: Colágeno sigma, control positivo. Fila 3: Colágeno extraído en el laboratorio.

5.1.10 Polivinil alcohol – Colágeno Tipo I – Apatita Carbonatada

Habiendo obtenido una fuente de colágeno e identificado el tipo de molécula, se procedió a realizar la suspensión para el hidrogel compuesto, el cual se trabajó, según los análisis de resultados, en composición de PVA 6:94, Colágeno 0,8% y CAp 0.6% (Protocolo Anexo 11). Se hizo inicialmente la mezcla entre PVA y CAp para realizar el proceso de congelación y descongelación, posterior a esto se adicionó el colágeno y la suspensión completa se congeló lentamente con el proceso que se describió inicialmente para los hidrogeles de solo PVA y se muestra en la Figura 21. Esto se hizo en un sistema asilado con poliestireno a -20°C por 36 horas, al término de las cuales se liofilizaron las muestras.

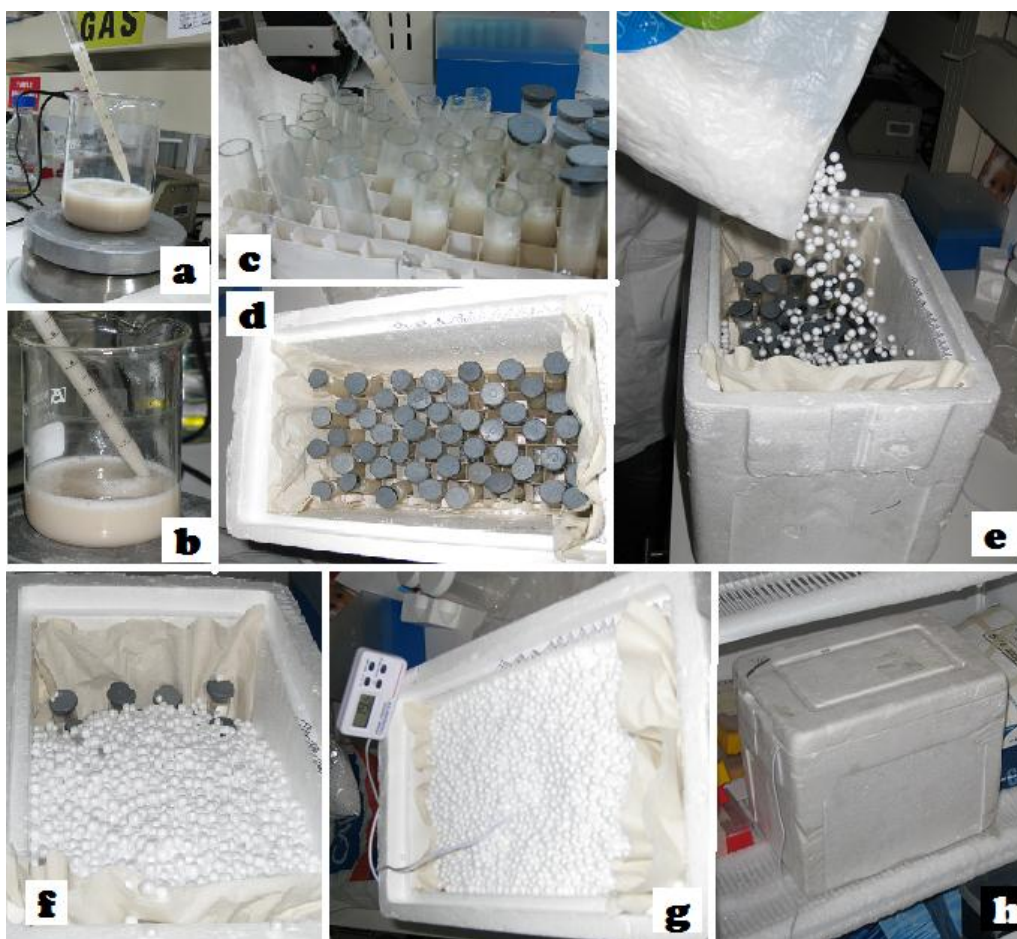


Figura 21. Sistema de congelación final. Método de congelación de los hidrogeles para garantizar el mayor tamaño de poro posible. (a) La solución de PVA –Col I-Cap se dejó 10 minutos en agitación a 45°C para garantizar su homogeneidad. (b) Se puede ver la solución del hidrogel compuesto y su color. (c) La muestra fue servida en mangueras que fueron selladas con tapones en ambos extremos. (d) cuando se sirvió la totalidad de las muestras estas, dispuestas en una gradilla, se colocaron dentro de una caja de icopor. (e y f) Para aislar las muestras del frío directo la caja fue llenada con bolitas de poliestireno en su totalidad. (g) Antes de cerrar la caja un termómetro digital fue ubicado en el interior y fue tomada la temperatura inicial, se monitoreo el descenso de la temperatura. (h) Ya la caja completamente sellada fue colocada en el congelador a -20°C.

Posterior a esto las muestras fueron sometidas al tratamiento DHT por 24 horas a 130°C con vacío y al terminar el proceso las muestras se cortaron en pequeños cilindros de 0,5cm de altura y por último fueron esterilizadas por medio de gas de Óxido de Etileno para el uso en los cultivos celulares. Su apariencia final se puede ver en la Figura 22.



Figura 22. Hidrogeles PVA-Col I-CAP. Apariencia de (a) Hidrogeles en seco (b) Hidrogel después de la hidratación con agua.

Se confirmó el tamaño y disposición de los poros del hidrogel final, a través del análisis de imágenes de microscopia electrónica de barrido (Figura 23) donde se evidencia que el tamaño de los poros alrededor de 100 μm y su morfología elipsoide, como se esperaba inicialmente, además se evidencio la inter conectividad de los poros y la disposición de los cristales de Apatita en el material.

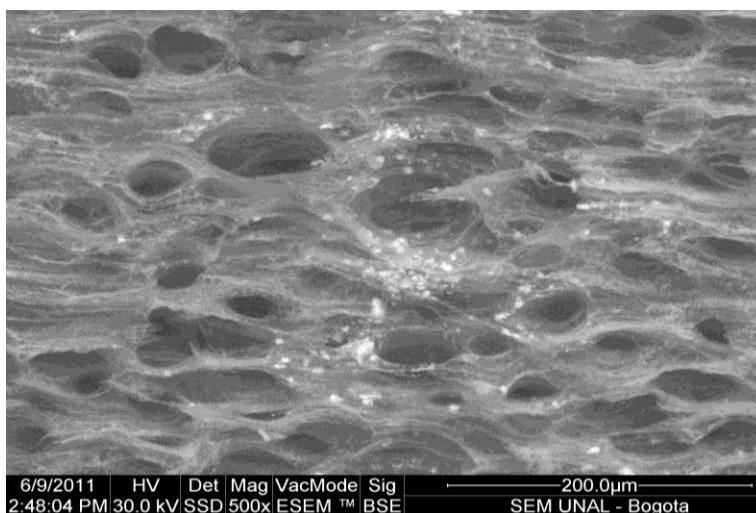


Figura 23. SEM para PVA-Col I-CAP. Micrografía del hidrogel compuesto por PVA 6:94 -Colágeno tipo I 0,8% - CAP 0.6%. Barra corresponde a 200 μm . Se pueden ver los poros en el hidrogel de un tamaño aproximado a 100 μm , de forma elipsoide, distribuidos en toda la superficie. Además se pueden ver de los cristales de CAP incorporados al material (Gránulos blancos en la superficie).

En el análisis del difractograma XRD se comprobó que no cambio el patrón ya obtenido pero si aparece claramente un nuevo pico que corresponde al cristal de Apatita Carbonatada lo que indica la correcta integración del CAP al hidrogel (Figura 24).

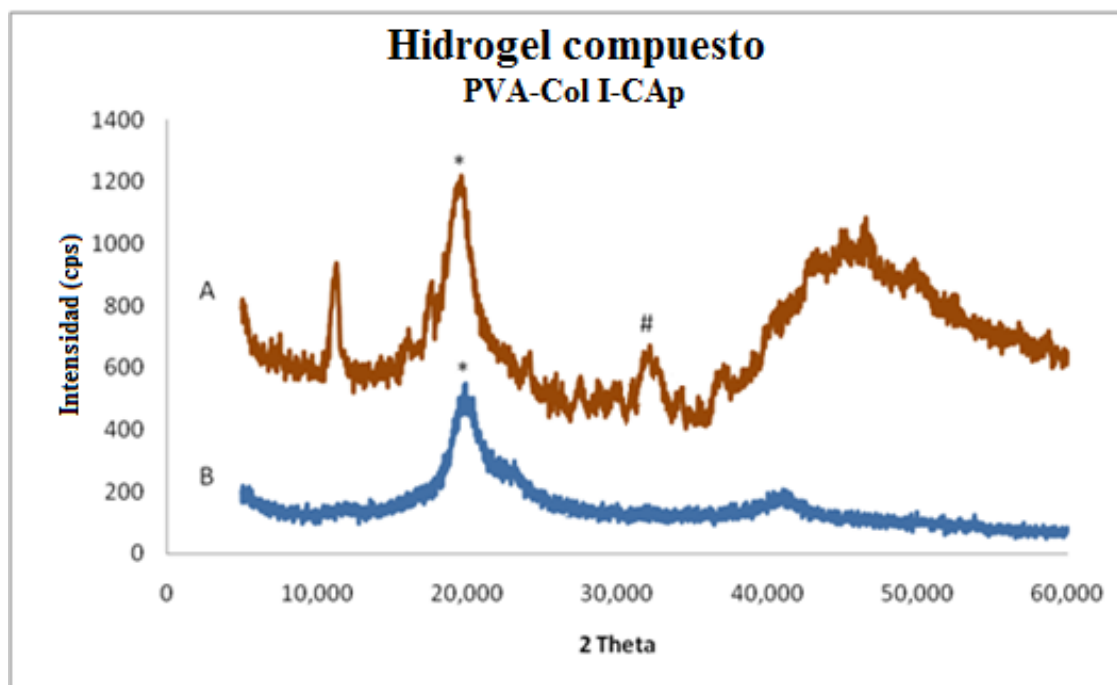


Figura 24.. Difractograma XRD para PVA-Col I-CAP. Picos correspondientes a: (*) PVA; (#) CAP ; (A) hidrogel compuesto y (B) hidrogel PVA. Se determina la intensidad en ciclos por segundo (cps) del rayo en un ángulo de observación 2θ .

Para el caso del FTIR (Figura 25) muestra el *stretching de OH* a 3255 cm^{-1} , *asymmetric stretching de CH₂* a 2908 cm^{-1} , *stretching de CO* a 1705 cm^{-1} , amida III a 1242 cm^{-1} , *stretching de CC* y *bending de OH* a 1082 cm^{-1} , *rocking de CH₂* a 840 cm^{-1} , que se ven con menor intensidad en el hidrogel compuesto que en el hidrogel de PVA, excepto el pico de amida II a 1573 cm^{-1} el cual aumenta la intensidad. El cambio en el patrón de picos indica que hay un posible entrecruzamiento entre el colágeno y las fibras poliméricas de PVA.

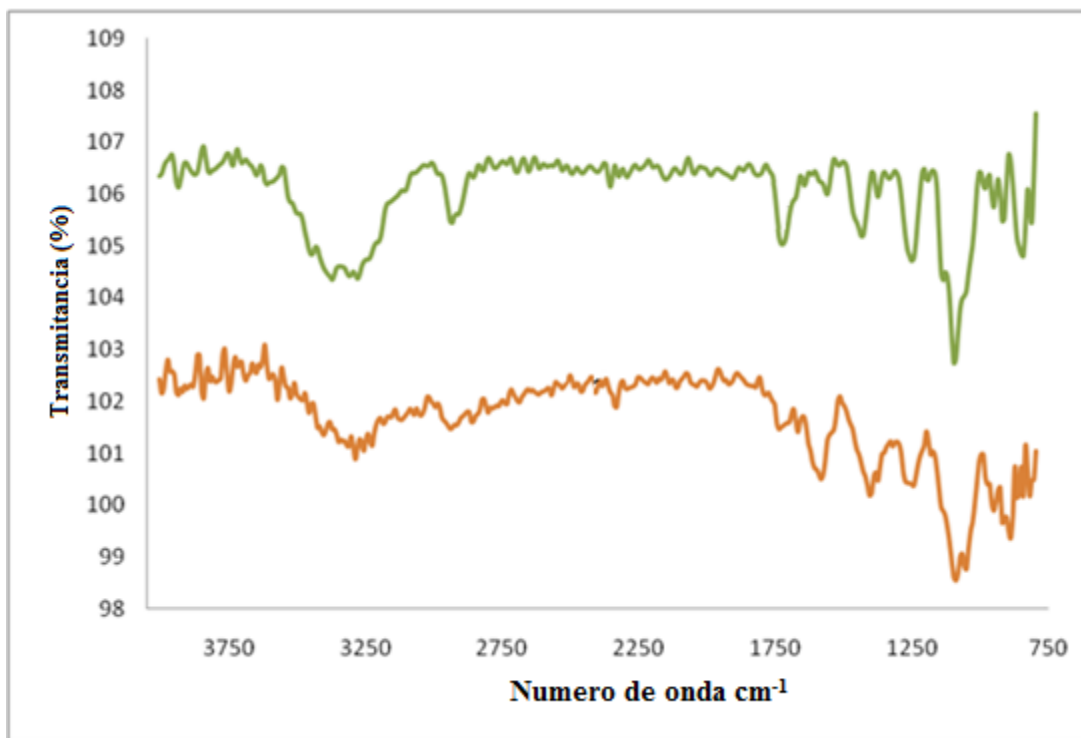


Figura 25. Espectro FTIR para PVA-Col I-Cap. Hidrogeles PVA (arriba) y PVA 6:94 - Colágeno tipo I 0,8%- CAP 0,6% (abajo). Se evalúa la transmitancia (%) obtenida para cada pico ubicado en un número de onda característico.

El incremento del valor T_m , el grado de cristalinidad y el tamaño del cristal de PVA como se ve en la Tabla confirman lo anteriormente dicho.

Tabla 9. Datos DSC para PVA-Col I-Cap. Comparación entre el tamaño de cristal de hidrogeles PVA y el hidrogel compuesto PVA-Col I-Cap

					Cristalinidad	Tamaño del
Muestra	Tg (°C)	Tm (°C)	Tc (°C)	ΔH_f (J/g)	(%X)	cristalito Å
PVA	71,959	215,79	210,11	6,486	4,68	51
PVA-COL I-Cap	70,664	217,35	210,27	6,7645	4,88	64

5.2. Cultivo primario de células de médula ósea de porcino

Las células osteoprogenitoras utilizadas para los análisis fueron obtenidas por medio de lavados de huesos largos de la médula ósea de porcinos de una semana de vida, las cuales se mantenían congeladas y fueron reactivadas y monitoreadas mediante cultivo en DMEM (medio Eagle's modificado por Dulbecco) y MCDB (Medium complete with trace elements) en proporción 60:40, respectivamente, inicialmente con 50% suero fetal bovino, el cual se fue reduciendo gradualmente hasta llevarlo al 2%. Cuando las células ya presentaban una confluencia del 80% y mostraban una morfología fibroblastoide fueron tomadas y dispuestas en los diferentes tratamientos a evaluar.

Para este ensayo se plantearon 4 tratamientos.

1. Cultivo de células de médula ósea sobre placa de cultivo suplementado con 2% SFB.
2. Cultivo de células de médula ósea sobre placa de cultivo suplementado con 10% SFB e inductores de diferenciación (10^{-8} M dexametasona, 50 μ M L-ascorbato-2-fosfato y 10 mM beta-glicerolfosfato)
3. Cultivo de células de médula ósea sobre el hidrogel PVA-Col I-CAp suplementado con 2% SFB.
4. Cultivo de células de médula ósea sobre el hidrogel PVA-Col I-CAp suplementado con 10% SFB e inductores de diferenciación (10^{-8} M dexametasona, 50 μ M L-ascorbato-2-fosfato y 10 mM beta-glicerolfosfato).

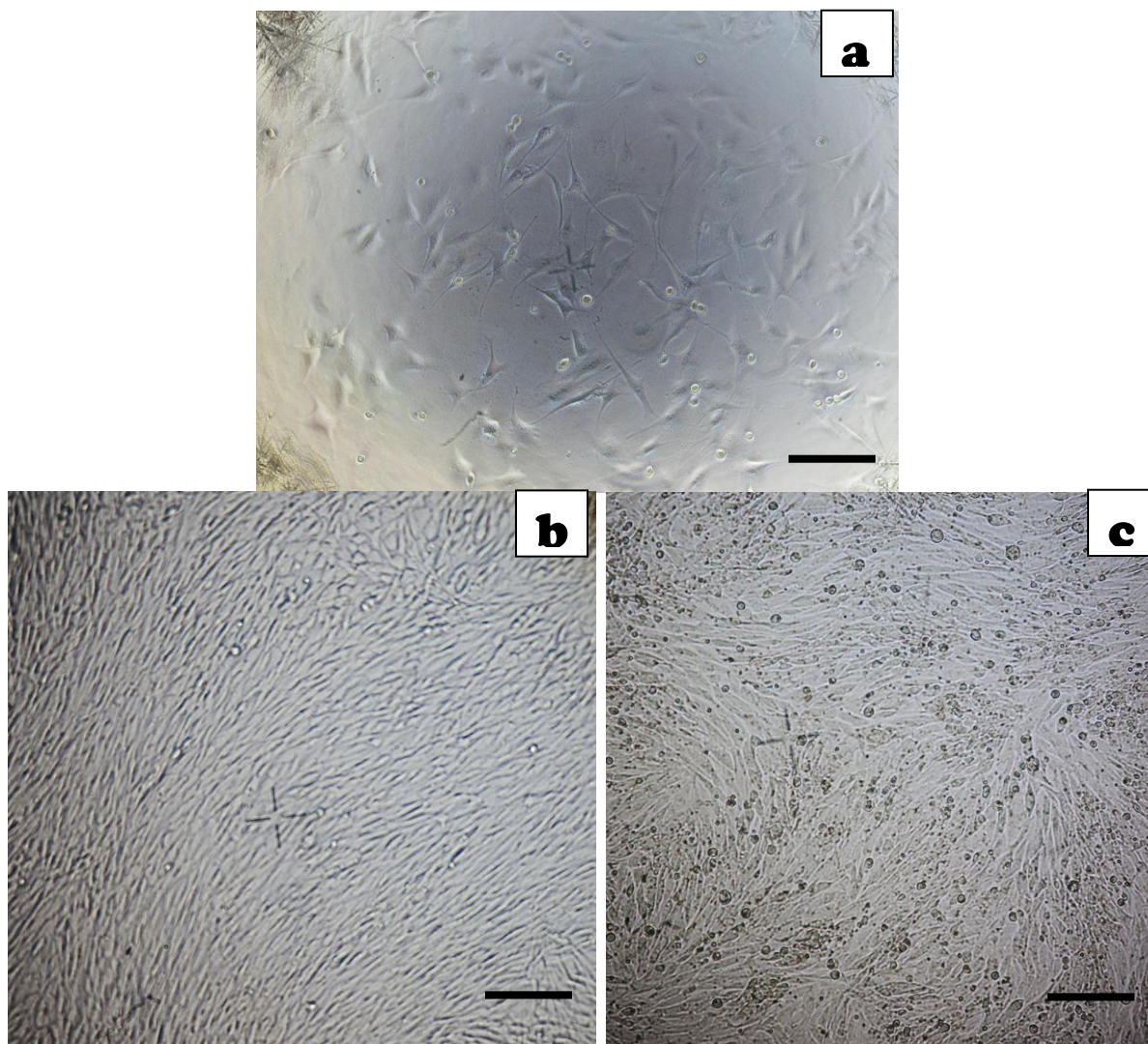
Además se planteo el control positivo con células de la línea celular de osteoblastos humanos (CRL – 11372 de ATCC) sembradas sobre el hidrogel PVA-Col I-CAp a la misma densidad con inductores de diferenciación (10^{-8} M dexametasona, 50 μ M L-ascorbato-2-fosfato y 10 mM beta-glicerolfosfato). Y el control negativo con células Vero: African green monkey kidney Linea ATCC CCL81 suplementado con 2% SFB.

Los cultivos se realizaron por triplicado en placas de cultivo de 48 pozos a una densidad de 2×10^4 células/cm², inoculando 0,5 mL de medio por pozo y los medios se cambiaron cada 4 a 5 días. Los ensayos planteados se realizaron a los días 0, 10, 20 y 35 y los resultados obtenidos fueron comparados entre los modelos celulares cultivados sobre la matriz PVA-Col I-CAp y su control cultivado sobre placas de cultivo, así como con los controles sembrados sobre el hidrogel (positivo y negativo) para determinar el potencial de osteoconductividad y osteoinductividad del hidrogel seleccionado.

5.2.1. Determinación del potencial de osteoconductividad de la matriz de PVA-Col I-CAp

5.2.1.1. Morfología celular

El análisis de la morfología celular en cada grupo se realizó por microscopía óptica sobre las placas de cultivo como se ve en la Figura 26.



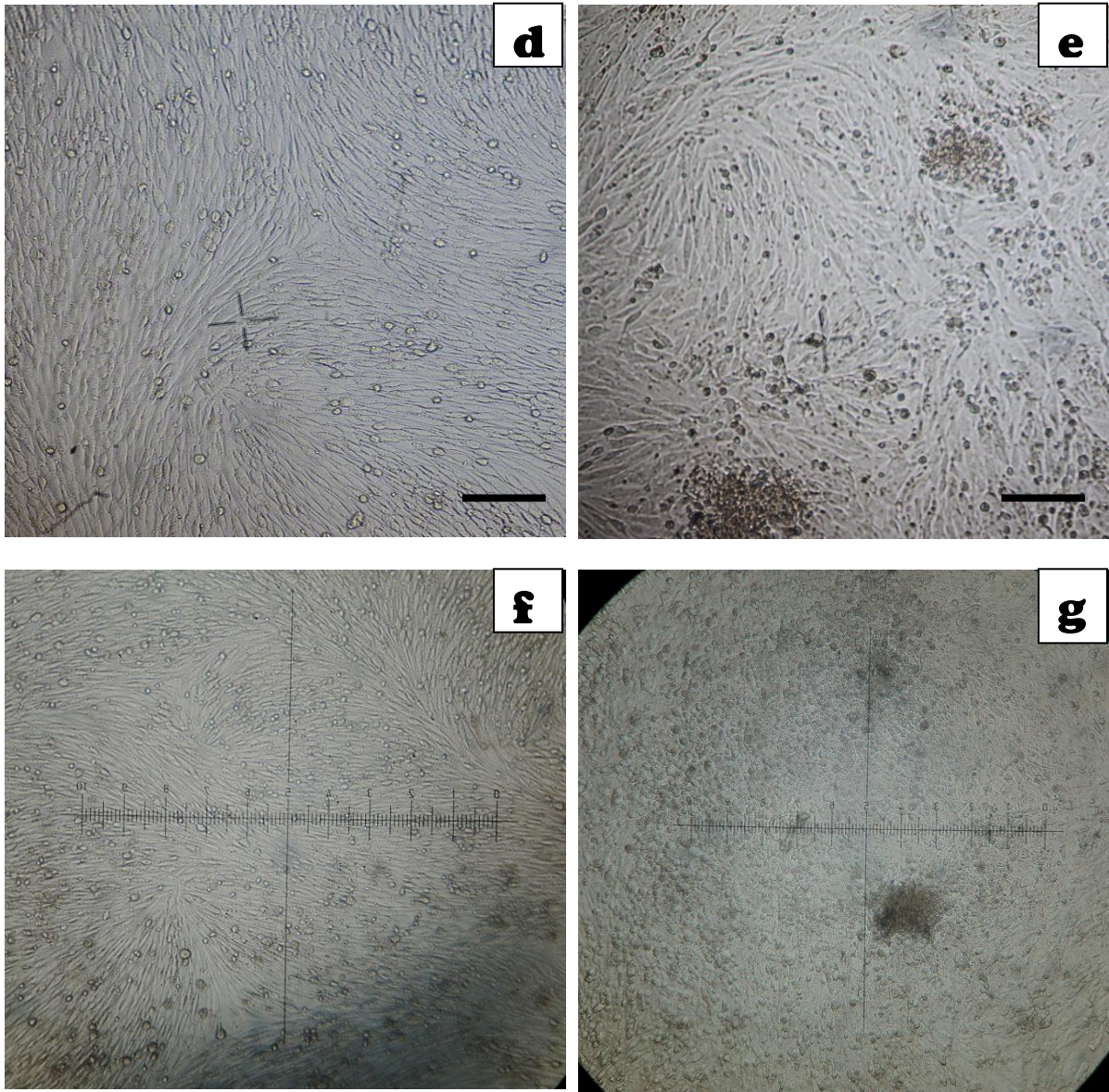


Figura 26. Morfología celular a través del tiempo. Células de Medula Ósea sembradas en placa tratadas con o sin factores de inducción osteoblástica (a) Tiempo 0 días (b) Tiempo 10 días sin factores (c) Tiempo 10 días con factores (d) Tiempo 20 días sin factores (e) Tiempo 20 días con factores (f) Tiempo 35 días con factores (g) Tiempo 35 días con factores. La barra corresponde a 1000µm, al igual que cada centímetro en la reglilla de los paneles f y g.

En la imagen, al iniciar el cultivo en día 0 (Figura 26 a) las células se ven con morfología alargada y fibroblastoide y se inicia el ensayo con una confluencia a aproximada del 35%. A los 10 días de tratamiento ya todos los pozos (replicas) para todos los tratamientos presentan una confluencia del 100% y se empiezan a ver las diferencias entre los tratamientos, las células sin factores (Figura 26 b) se ven organizadas y muestran una morfología ya no tan alargada pero siguen viéndose fibroblastoides mientras que las tratadas con factores (Figura 26 c) se ven de forma un poco más

desorganizada, su forma empieza a tornarse ovalada y se ven pequeñas agrupaciones de células. Para los 20 días de cultivo las células sin factores (Figura 26 d) empiezan a mostrar una morfología más ovalada y se ven escasos grupos celulares de reducido tamaño mientras que las tratadas con factores (Figura 26 e) ya muestran claras agrupaciones celulares y su morfología es más cuboide. Y para el tiempo 35 días de análisis las tratadas sin factores (Figura 26 f) muestran un cambio de morfología más evidente, un poco más cuboide, y las agrupaciones celulares se ven con mayor claridad y las células tratadas con factores presentan agrupaciones de gran tamaño (Figura 26 g) y su morfología es claramente cuboide. Esto demuestra que la morfología de las células evaluadas (células obtenidas de la médula ósea de porcino para cultivo primario) es susceptible a cambios cuando son tratadas con factores de diferenciación osteoblástica y su comportamiento es similar al descrito en la literatura cuando las células entran en diferenciación.

Las células en el hidrogel no se podían ver directamente en el microscopio así que se analizaron por cortes histológicos del mismo, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina - Eosina (HE) los cuales tiñen los núcleos de morado y los citoplasmas rosados y Tricromico de Masson (TM) donde se puede apreciar los núcleos de color morado, el citoplasma de color rojo y las fibras de colágeno de color azul. Estos colorantes se utilizaron ya que con HE se querían ver las células y su distribución y con el TM se quería además de ver las células, las fibras de colágeno incrustadas en el material. Para hacer observaciones en microscopia óptica y evaluar las características de las células. La matriz de PVA-Col I-CAP que no contenía células fue empleada como control de las tinciones.

Las células son claramente visibles con ambos tipos de tinción y las células muestran con claridad los colores previamente enunciados, el colágeno en el hidrogel se puede ver como manchas un poco más oscuras en la matriz, pero no se ven fibras de gran tamaño ni aglomeraciones del compuesto. Al analizar las muestras se encontró que a las 24 horas después de la inoculación de las células estas se adhieren a la superficie de los hidrogeles, pasados los primeros 10 días de incubación las células se encuentran distribuidas ya en el interior de los hidrogeles (Figura 27). Con ambas tinciones se pueden ver las células ocupando los espacios libres dejados por los poros y distribuidas desde la superficie hasta el interior del hidrogel, con el paso de los días se pueden ver agrupaciones celulares especialmente hacia los poros del interior del hidrogel, con la tinción TM. No se evidencia una diferencia significativa entre las células tratadas con factores de diferenciación y las que si fueron tratadas con estos.

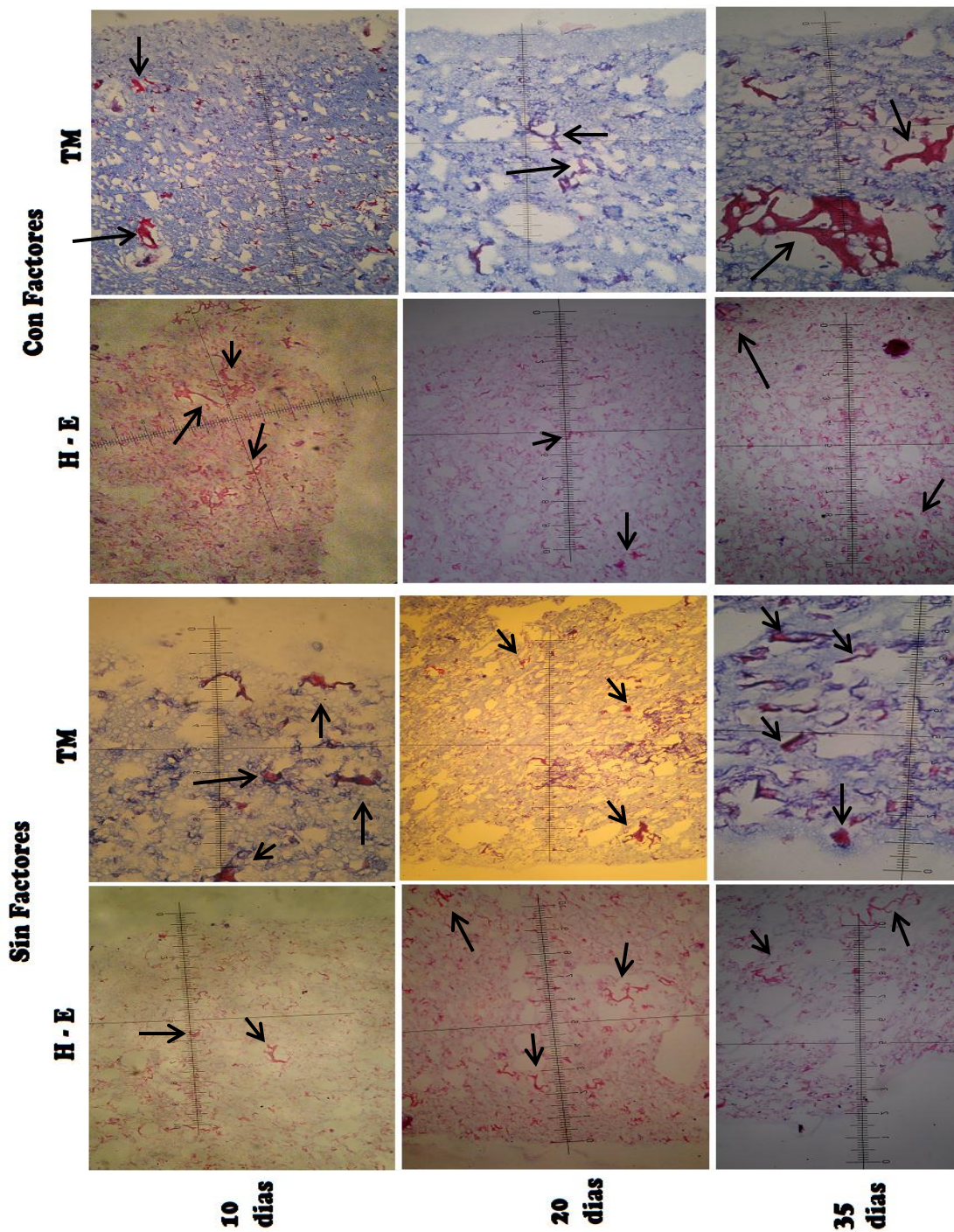


Figura 27. Tinción Hematoxilina-Eosina y Tricómico de Masson. Células de la medula ósea de porcinos sembradas sobre hidrogel PVA-Col I-CAP Tratadas o no con factores de inducción osteoblástica. Muestras con tinción Hematoxilina - Eosina donde se evidencia el citoplasma rosado y los núcleos morados y tinción con Tricómico de Masson donde el citoplasma presenta un color rojo y los núcleos un color lila. Cada centímetro de la reglilla equivale a 500µm, excepto en el panel 10 días TM Sin factores, 20 días TM Con factores, 35 días TM Sin factores y 35 días TM Con factores, donde cada centímetro equivale a 1000µm. Las flechas señalan las células al interior de los pozos.

Por último se evaluaron los hidrogeles también por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras para esta prueba fueron analizadas en la superficie y otros fueron congelados en nitrógeno líquido y fracturados para poder ver el interior de los mismos, Inicialmente se pudo comprobar que el hidrogel cuenta con una porosidad que esta entre 80 a 120 micras y que esta claramente interconectada; además de que las células son capaces de adherirse a la superficie del hidrogel e invadirlo por los poros como se puede ver en la Figura 28.

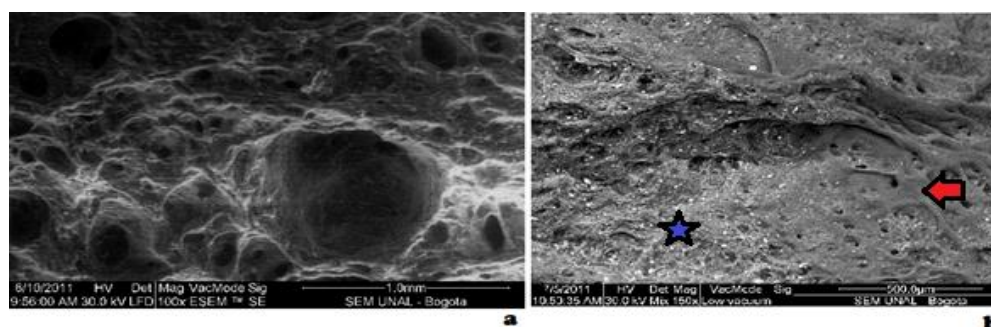


Figura 28. SEM para hidrogel con y sin células. **(a)** Hidrogel sin células después de 10 días inmerso en medio de cultivo, destacando macro poros, barra de 1mm. **(b)** Célula de la medula ósea de porcino (superficie lisa con ramificaciones, señalado por la flecha roja) establecida en el interior del hidrogel (superficie rugosa, señalado por la estrella azul) a 10 días de cultivo, barra de 500 µm.

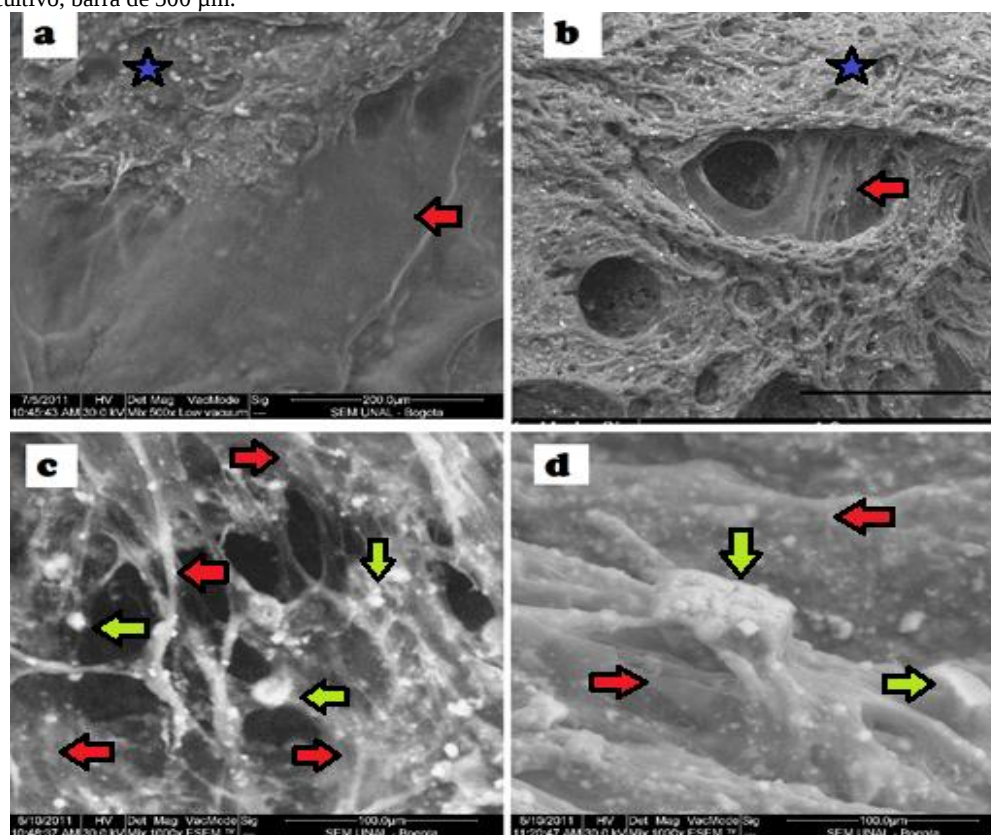


Figura 29. SEM para cultivo celular en el tiempo. Análisis de las células de medula ósea sembradas sobre el hidrogel **(a)** Célula adherida a la superficie del hidrogel luego de 24 horas de inoculación, célula de superficie lisa, marcada con la flecha roja. Hidrogel rugoso, marcado con la estrella azul. Barra de 200µm; **(b)** células a 10 días, macro poros en el interior del hidrogel y célula invadiendo el interior del poro. Se puede ver la célula de superficie lisa, marcada con la

flecha roja y el hidrogel marcado con la estrella azul. Barra de 500µm (c) matriz extracelular a 20 días de cultivo, célula cubriendo en su totalidad el hidrogel, señalada con flechas rojas y aparición de posibles depósitos mineralizados señalados con flechas verdes (d) matriz extracelular a 35 días, hidrogel cubierto totalmente por células, señaladas con flechas rojas y se aprecian depósitos semejantes a nódulos de mineralización electro difusos (blancos) en la matriz extracelular, señalados con flechas verdes. Barra de 100µm.

Cuando se analizaron las imágenes por días para los cultivos de células de medula ósea de porcinos (Figura 29) se encontró (a) que las células se adherían, (b) se distribuían en el interior de los poros e inmediatamente se establecían iniciaba el proceso de diferenciación sin importar si los hidrogeles eran o no tratados con factores de inducción osteoblástica, (c) mostrando el inicio de deposición de matriz extracelular ya evidente a los 20 días de cultivo, y estos depósitos son mas evidentes a lo largo de los días (d) donde se aprecian depósitos semejantes a nódulos de mineralización electro difusos (blancos) en la matriz extracelular.

Se puede sugerir entonces que el hidrogel PVA-Col I-CAp si tiene un efecto osteoinductivo sobre las células sin factores y como consecuencia inicia la aparición de depósitos semejantes a nódulos de mineralización en la matriz extracelular (gránulos blancos). A los 35 días de cultivo se pudo observar la presencia de partículas agrupadas en estructuras semejante a nódulos tanto en cultivos inducidos como en los no inducidos (Figura 30 a y b) y las características morfológicas de estos nódulos son semejantes a los encontrados en el control positivo a los 35 días de cultivo (línea celular de pre-osteoblastos humanos inducido con factores) como se puede ver en la Figura 30 c.

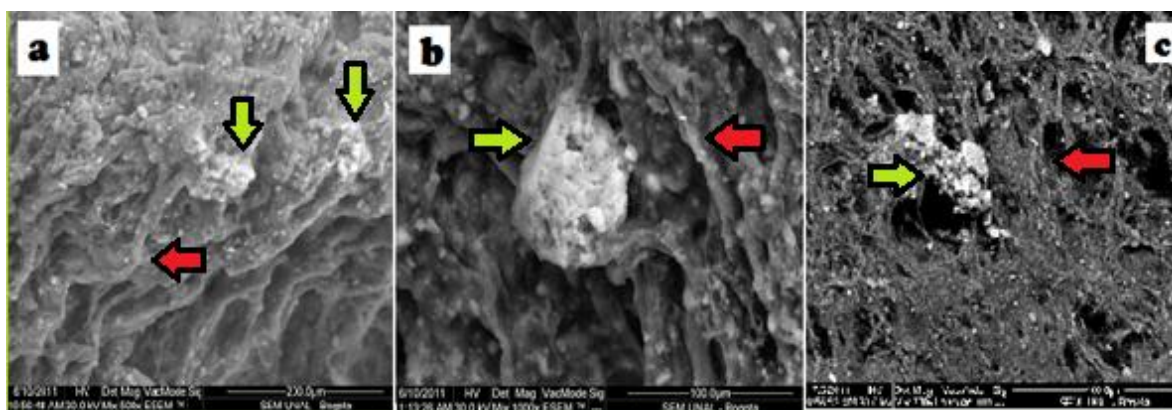


Figura 30. Análisis de depósitos de nódulos de calcio por SEM: (a) Corte al interior del hidrogel destacando matriz extracelular de las células de medula ósea de porcino a los 35 días de cultivo en medio sin factores de diferenciación, con aparentes nódulo de calificación, señalado con flechas verdes y las células cubriendo la totalidad del hidrogel señalado con la flecha roja. La barra equivale a 200 µm. (b) Detalle de un nódulo de una célula de medula ósea a 35 días de cultivo en medio con factores de diferenciación. Nódulo señalado con la flecha verde y las células cubriendo la totalidad del hidrogel señalado con la flecha roja. La barra equivale a 100 µm. (c) Detalle de un nódulo de un pre-osteoblastos humanos ATCC a 35 días de cultivo en medio con factores de diferenciación. Nódulo señalado con la flecha verde y las células cubriendo la totalidad del hidrogel señalado con la flecha roja. La barra equivale a 400 µm

5.2.1.2. Determinación del número de células

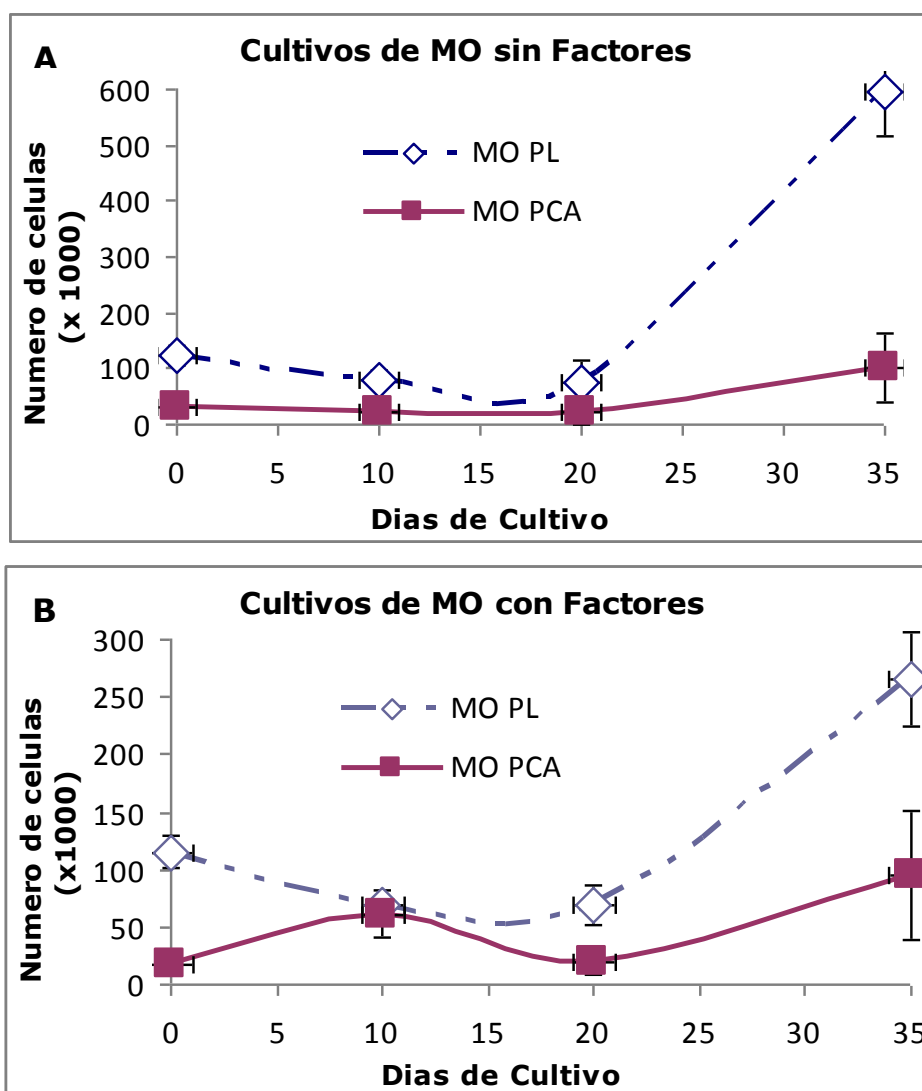
Las células cultivadas se evaluaron a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo (Ver datos del ensayo Anexo 16). Se determinó indirectamente el número de células mediante la evaluación del p-nitrofenol liberado a 405nm (actividad hexosaminidasa, nKat), en un espectrofotómetro Ultrospect 6300Pro (Amersham Biosciences). El cálculo aproximado del número de células de los grupos se determinó indirectamente extrapolando los valores obtenidos en una curva de calibración realizada previamente del p-nitrofenol liberado por actividad hexosaminidasa contra número de células (Anexo 12 - 15) para cada soporte y tipo celular.

Los datos obtenidos y sus correspondientes intervalos de confianza se calculan a partir de:

$\left[\bar{x} \pm 1.96 \left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \right]$, donde $\bar{x}$ corresponde al promedio, σ corresponde a la desviación estándar, n corresponde al número de repeticiones y 1,96 es el área bajo la curva para $1 - \alpha/2 = 0.95$, muestran que en los cultivos de células de la médula ósea de porcino, el número de células tiende a mantenerse constante o se reduce levemente durante los primeros 10 días, ocurriendo un incremento significativo a los 35 días de cultivo, tanto en el tratamiento sobre el hidrogel PVA-Col I-CAP como en el control sobre placa. Solo los pre-osteoblastos humanos ATCC que estaban sobre el hidrogel mostraron el pico a los 20 días de cultivo, con una leve reducción a los 35 días. Al comparar el número de células de la médula ósea en la matriz PVA-Col I-CAP con el control de las mismas células sembradas sobre placa, no se aprecian diferencias en el patrón de crecimiento pero si una diferencia significativa en el número de células al tiempo 35 (Figura 31).

En las graficas se puede ver también que el número de células presentes en las placas en general es mayor a las que se ven en los hidrogeles PVA-Col I-CAP. Se esperaba que los resultados presentaran una mayor proliferación sobre los hidrogeles ya que al tener una estructura tridimensional, las células tendrían una mayor área para proliferarse frente al área que brindan las placas (bidimensional) que seria mas reducida para el crecimiento celular. Se cree entonces que hay factores que podrían estar afectando la lectura de la actividad hexosaminidasa de las células ya que en los resultados con tinción histológica se demostró que las células están invadiendo los poros internos del hidrogel. Este efecto se puede atribuir posiblemente a que tal vez los hidrogeles están reteniendo parte del p-nitrofenol por absorción lo que enmascara el dato real o que solo se esté tomando la actividad hexosaminidasa de las células que están en la superficie del hidrogel y no en su interior. Para asegurar esto es necesario realizar el conteo celular por otro método.

Aunque los valores obtenidos no son concluyentes en cuanto a proliferación si se podría decir que las células no pierden viabilidad durante todo el ensayo para todos los tratamientos evaluados. Esto indica que la matriz PVA-Col I-CAp no parece ser citotóxica o tener un efecto adverso sobre la adhesión y posible crecimiento del cultivo primario de células de la médula ósea de porcino ni sobre líneas celulares establecidas, fueran estas inducidas o no al linaje osteoblástico. Sugiriendo que el hidrogel es biocompatible no solo con células de médula ósea, sino con otro tipo de células. Tampoco parece responder de forma adversa a la aplicación de factores de diferenciación osteogénica en los cultivos, al contrario parece incrementar el efecto en los cultivos tratados con los mismos.



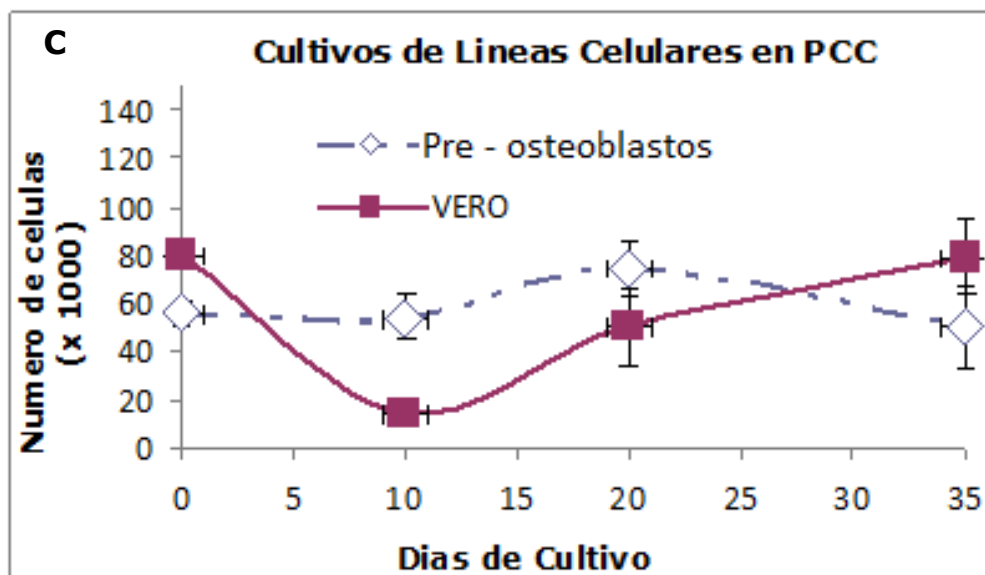


Figura 31. Número de células determinado por actividad hexosaminidasa: (A) Células de médula ósea de porcino (MO) sembradas en placa (PL) o sobre el hidrogel PVA-Col I-CAp (PCA) sin factores de inducción a diferenciación osteoblástica, (B) MO sembradas en placa o sobre el hidrogel PCA con factores de inducción, (C) línea pre-osteoblastos ATCC con factores y células VERO. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%. El número de repeticiones (n) para cada tiempo fue tres.

5.2.2. Determinación del potencial osteoinductividad de la matriz de PVA-Col I-CAp

Teniendo en cuenta que durante el tiempo de cultivo de las células en el ensayo se encontró que la matriz de PVA-Col I-CAp permite la adherencia y colonización tridimensional de las células, procesos determinantes para el desarrollo de los procesos básicos y considerando además que hay un evidente incremento en el número de células a través del tiempo, se evaluó si la matriz seleccionada permitía la expresión de un fenotipo similar al osteoblasto en las células aisladas de médula ósea de porcino en comparación con pre-osteoblastos ATCC. Para esto se realizaron los siguientes análisis.

5.2.2.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)

La ALP de las células cultivadas se midió del p-nitrofenol liberado del sustrato p- nitrofenilfosfato en pH alcalino (D'ippolito *et al.*, 2002; Jaiswal *et al.*, 1997; Manuey *et al.*, 2004), a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo y se analizó por espectrofotometría a 405nm en un lector de ELISA (Ver datos

del ensayo Anexo 18). Para comparar la ALP, los datos de absorbancia obtenidos fueron analizados con la ayuda de una curva estándar realizada previamente con datos de ALP conocidos (Anexo 17).

Al comparar los datos obtenidos de los intervalos de confianza de la actividad ALP (normalizada en nanokatales de 4-nitrofenol/ 10^3 células) en cultivos de médula ósea sobre placa (Figura 32 a), en presencia o en ausencia de factores de diferenciación osteoblastica, se evidencia un incremento significativo en la actividad a los 10 días de cultivo en los cultivos inducidos. Con el paso de los días los tratamientos inducidos y no inducidos con los factores presentan una actividad similar. Esto corresponde a lo esperado para cultivos de médula ósea sembradas sobre placas inducidos a osteoblastogénesis. Para los cultivos realizados sobre el hidrogel PVA-Col I-CAp (Figura 32 b), la actividad presenta una diferencia mucho más marcada, donde los cultivos inducidos muestran un aumento significativo en la actividad frente a los cultivos no tratados ya a los 10 días de tratamiento y se mantiene la diferencia hasta el día 35 donde la diferencia ya no es tan marcada pero sigue siendo significativa.

Cuando se compara la actividad ALP presentada en los cultivos de células de médula ósea inducidos con factores de diferenciación osteoblástica sobre los dos soportes evaluados (Siembra en placa o en Hidrogel), se encuentra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los puntos de evaluación a través del tiempo (Figura 32 c). También se encontró que cuando se comparan los cultivos de células de médula ósea de porcino contra la línea de pre-osteoblastos humanos ambos tratados con inductores de osteogénesis y sembrados sobre el hidrogel PVA-Col I-CAp se encuentra que la actividad presenta un patrón semejante aunque en los puntos 10 y 20 días hay diferencia significativa en la actividad ALP (Figura 32 d), donde para las células de la médula ósea es más alta sugiriendo aún así que el hidrogel como soporte del cultivo no afecta negativamente la expresión del marcador ALP durante la inducción de células de médula ósea de porcino hacia osteoblastogénesis.

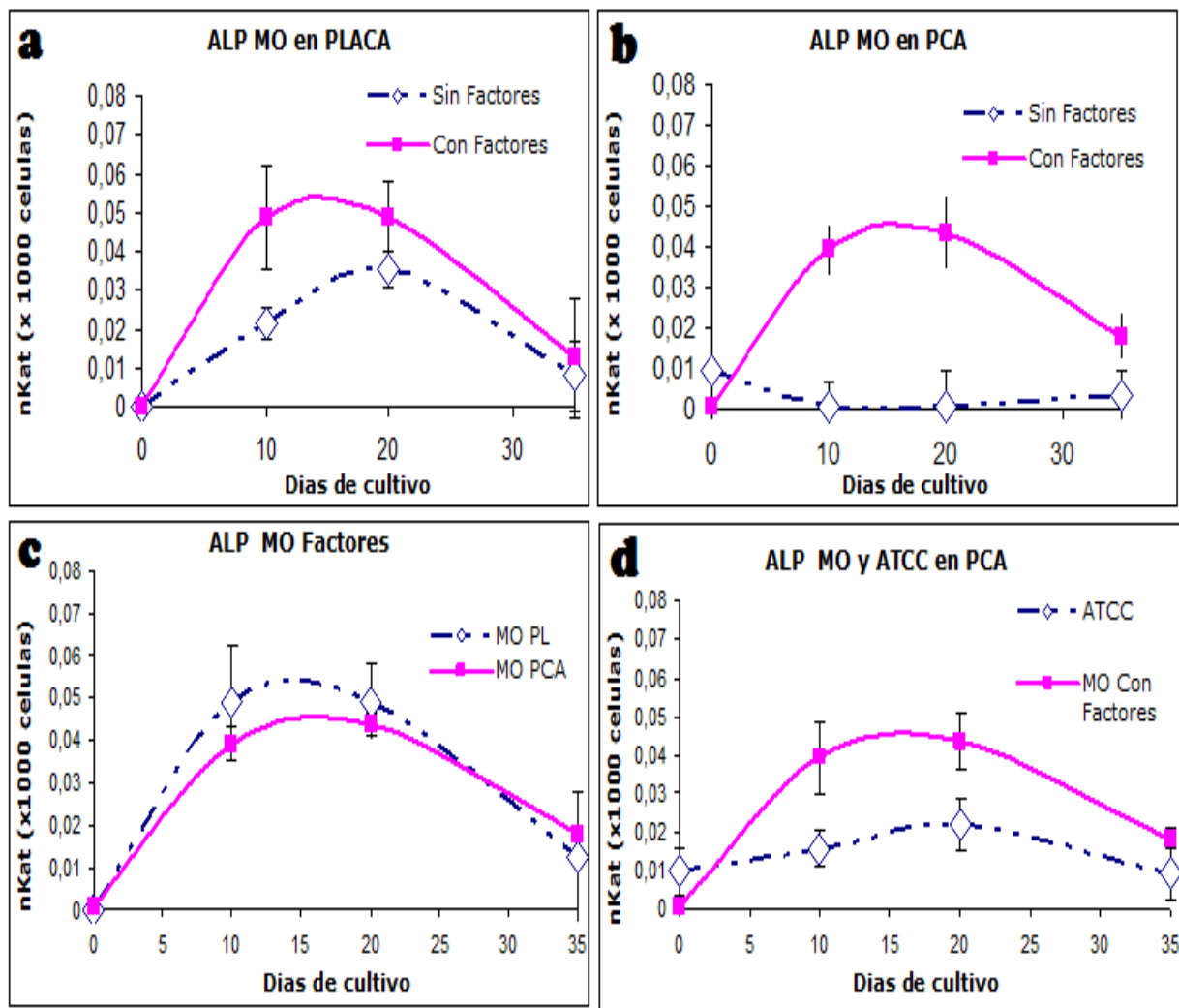


Figura 32. Actividad fosfatasa alcalina (ALP). Medida a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo. **(a)** Células de medula ósea (MO) cultivadas en placa (PL) en presencia o ausencia de factores de inducción a diferenciación osteoblástica **(b)** Células de medula ósea (MO) cultivadas en hidrogel PVA-Col I-Cap (PCA) en presencia o ausencia de factores de inducción a diferenciación osteoblástica. **(c)** Células de medula ósea (MO) en presencia de factores de inducción a diferenciación osteoblástica, cultivadas sobre hidrogel PCA o sobre placa (PC) **(d)** Células de medula ósea (MO) y células de la línea de pre-osteoblastos humanos (ATCC) en presencia de factores de inducción a diferenciación osteoblástica cultivadas sobre hidrogel PCA. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%. El número de repeticiones (n) para cada tiempo fue tres.

5.2.2.2. Formación de nódulos mineralizados

La formación de nódulos mineralizados se visualizó por incubación con 35 mg/mL de Xilenol Orange disuelto en medio completo 24 horas antes del análisis (Carretero, 2009), este parámetro se analizó a los 20 y 35 días de cultivo en las células sembradas sobre la placa y las que se encuentran sobre el hidrogel.

Lo primero que se realizó fue verificar que los soportes por si sólo no generaran la fluorescencia; así que se procedió a hacer la tinción en placa y en el hidrogel de PVA-Col I-CAP (Figura 33) se encontró que la tinción de hidrogel sin células con *xilenol orange* presenta puntos fluorescentes en amarillo-naranja, que muy probablemente corresponden a la absorción del colorante a los cristales de apatita carbonatada que hacen parte del hidrogel, de igual forma son nódulos muy pequeños que se consideraron al momento del análisis.

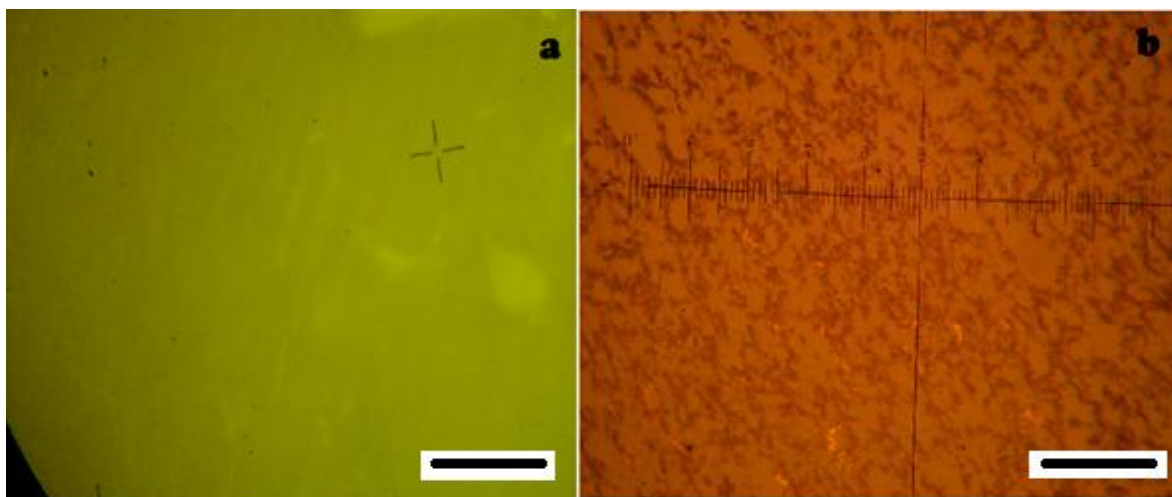


Figura 33. Tinción con Xilenol Orange control. (a) Placa de cultivo sin células. (b) Hidrogel de PVA-Col I-CAP sin células, donde se destacan pequeños puntos brillantes en el amarillo-naranja en el panel b. La barra corresponde a 200μm.

Las células de la médula ósea de porcino que fueron cultivadas sobre los hidrogeles de PVA-Col I-CAP y fueron teñidas a los 20 días de cultivo (Figura 34 Panel superior) mostraron la aparición de posibles nódulos similares a depósitos de calcio en ambos casos, no obstante las células tratadas con factores de inducción osteoblástica mostraron áreas fluorescentes color rojo-naranja mucho más grandes, y en mayor cantidad que las que se ven en los tratamientos sin inductores de diferenciación. Con el paso de los días estas áreas se hacen más frecuentes y de mayor tamaño en el cultivo y se puede ver un claro efecto positivo del hidrogel PVA-Col I-CAP en el tratamiento sin factores de diferenciación ya que al comparar las células cultivada con y sin factores de inducción estas diferencias cualitativas se hacen menos evidentes (Figura 34 Panel Inferior). Esto sugiere que las células de médula ósea de porcino podrían estar formando nódulos de mineralización sobre la matriz de PVA-Col I-CAP. Al comparar estos resultados con los obtenidos en los controles se puede ver que la coloración de los nuevos depósitos de calcio en las células de la médula ósea a los 35 días de cultivo, sin importar si son tratadas o no con factores de inducción, muestran una intensidad en la fluorescencia muy semejante a como lo hace el cultivo de la línea de pre-osteoblastos humanos

ATCC con el mismo tiempo de cultivo (Figura 35 b). De igual forma los pre-osteoblastos humanos presentan una mayor cantidad de nódulos desde el día 20 de cultivo en comparación a los tratamientos con células de la médula ósea (Figura 34 Panel superior – Figura 35 b). Por el contrario, las células VERO usadas como control negativo para la tinción de matriz celular calcificada, muestran fluorescencia verde-amarilla o naranja amarilla (Figura 35 c).

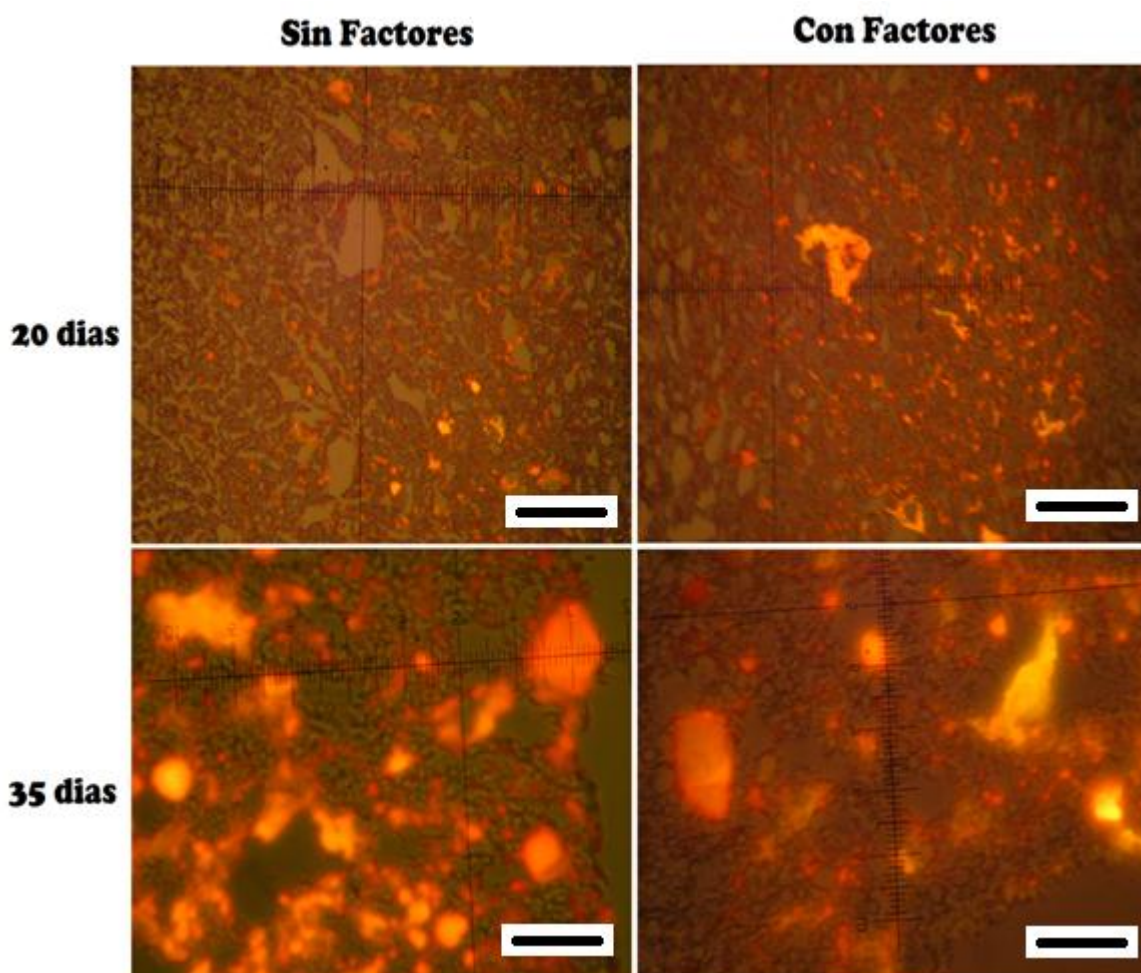


Figura 34. Formación de nódulos de mineralización determinados por la tinción con xilenol orange. Células de la médula ósea de porcino cultivadas sobre hidrogel PVA-Col I-CAp **Panel superior** 20 días de cultivo **Panel inferior** 35 días de cultivo **Panel izquierdo** células sin tratamiento con factores de inducción osteogénica **Panel derecho** células tratadas con factores de inducción osteogénica. La barra corresponde a 200µm.

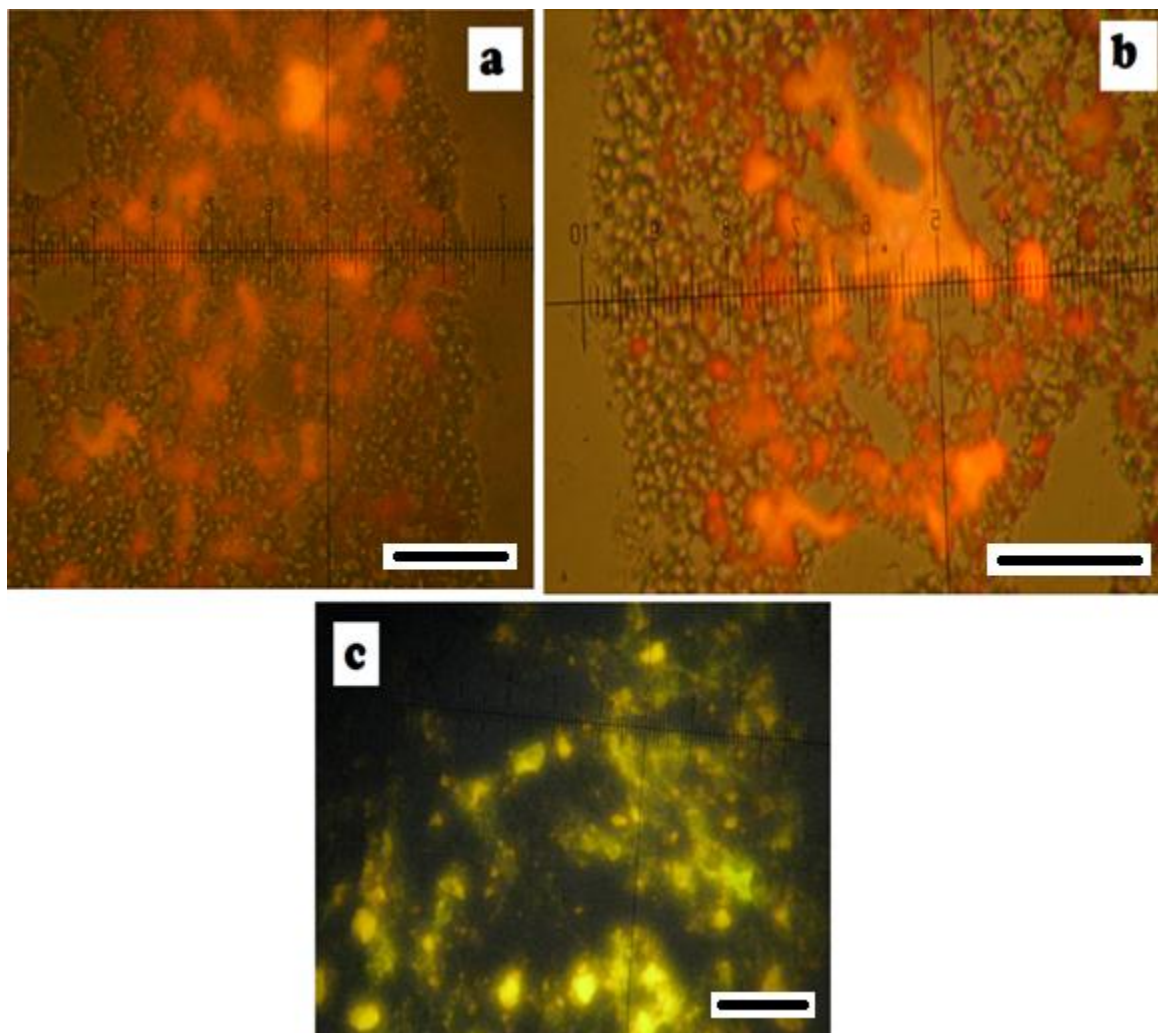


Figura 35. Formación de nódulos de mineralización determinados por la tinción con xilenol. **(A)** Línea pre-osteoblastos **ATCC** sobre hidrogel PVA-Col I-CAp tratadas con inductores osteogénicos a los 20 días de cultivo. **(B)** Línea pre-osteoblastos **ATCC** sobre hidrogel PVA-Col I-CAp tratadas con inductores osteogénicos a los 35 días de cultivo. **(C)** Línea **VERO ATCC** sobre hidrogel PVA-Col I-CAp a los 20 días de cultivo. La barra en cada foto corresponde a 200μm.

5.2.2.3. Determinación de marcadores moleculares

Se evaluó si la matriz de PVA-Col I-CAp permitía que las células de médula ósea y la línea de pre-osteoblastos **ATCC**, en proceso de diferenciación a osteoblastos, transcribieran genes relacionados con dicho linaje, para así, poder comprobar la efectividad del hidrogel como soporte. Además comprobar que este no afectaría la capacidad de las células evaluadas para expresar los marcadores específicos y como consecuencia el desarrollo de la matriz ósea. Esto se logró evaluando la expresión de diferentes marcadores moleculares típicos de la línea de diferenciación osteoblástica. Para esto se aisló entonces el RNA total a partir de las células cultivadas en los días 0, 10, 20 y 35 por el método de trizol (Gibco-BRL Life Technologies). El cDNA sintetizado se analizó para los

siguientes marcadores: MT1-MMP, MMP-2, osteopontina, osteocalcina, osteonectina, receptor de la hormona paratiroidea (RHP), y Runx2. Se utilizaron primers de β -actina como control.

Ya en los ensayos anteriores la morfología y la actividad de las células indican que estas están en proceso de diferenciación. Los resultados obtenidos aquí corroboran esta información. Los cultivos se ven inducidos a osteoblastogénesis transcribiendo genes que codifican para proteínas fundamentales en la formación de la matriz ósea (Figura 36 y Figura 37). Los transcritos de MT1-MMP se evidenciaron en todos los tratamientos sin importar si fueron inducidos o no, en el hidrogel también se evidenciaron en todos los tiempos a diferencia de los tratamientos sobre placa las bandas obtenidas para los transcritos en el hidrogel fueron de mayor intensidad. El caso para MMP2 es muy similar ya que también hay expresión para todos los tiempos en todos los tratamientos pero en este caso se presenta una intensidad muy similar en todas las bandas. Para el marcador Runx 2 se puede ver que en el caso de las células sembradas en placa la expresión empieza a partir del día 10 sin inductores y con inductores y se mantiene a través del tiempo hasta el día 35 mientras que en el caso de las células sembradas sobre el hidrogel hay expresión para los tiempos 10 y 20 días con y sin inductores.

Por otro lado, los transcritos para osteocalcina, una proteína expresada y secretada casi exclusivamente por células osteoblásticas en estados tardíos de maduración, se detectaron en las células de médula ósea cultivadas sobre placa sólo a partir del tiempo 20 días con factores y luego en el tiempo 35 para ambos tratamientos, mientras que para las células sembradas sobre el hidrogel se empieza a ver una expresión leve para los 10 días con factores y luego es intensa y constante hasta el día 35. La osteopontina que está relacionada con la adherencia de osteoblastos, fibroblastos y osteoclastos a la matriz mineralizada se expresa en los cultivos sobre placa a partir del día 10 sin factores de forma leve y luego aumenta la intensidad de la banda hasta el día 35 sin importar si es o no tratada con inductores mientras que en las células sembradas sobre el hidrogel su expresión empieza a partir del día 10 sin factores y se mantiene hasta el día 35 de forma constante para las células inducidas y no inducidas. La osteonectina es reconocida como una proteína que se une al colágeno y ayuda en la construcción de la matriz mineralizada, para este marcador los transcritos se expresaron a partir del día 10 con factores pero la banda obtenida es muy tenue, para el caso de las células sembradas sobre el hidrogel se puede ver que la expresión inicia a partir de los 10 días sin factores y se mantiene constante hasta los 35 días de cultivo, la diferencia más marcada es que las bandas aumentan de intensidad a partir de los 10 días de cultivo. Por último los transcritos para el receptor de la hormona paratiroidea (RHP) se detectaron en las células de médula ósea sobre las

placas a partir del día 10 de cultivo sin factores y su expresión se mantiene hasta el día 35 del cultivo sin factores, para el caso del cultivo a los 35 días con factores ya no se presenta expresión, mientras que para las células sembradas sobre el hidrogel la expresión inicio en el día 10 sin factores y fue aumentando en intensidad hasta el día 35 con factores.

Los pre-osteoblastos humanos de la línea ATCC sembrados sobre el hidrogel presentaron expresión de todos los transcritos para todos los tiempos como se puede ver en la Figura 38 al igual que se puede corroborar la expresión de β Actina (Control positivo de la transcripción y la amplificación) en las tres figuras para todos los tratamientos en todos los tiempos.

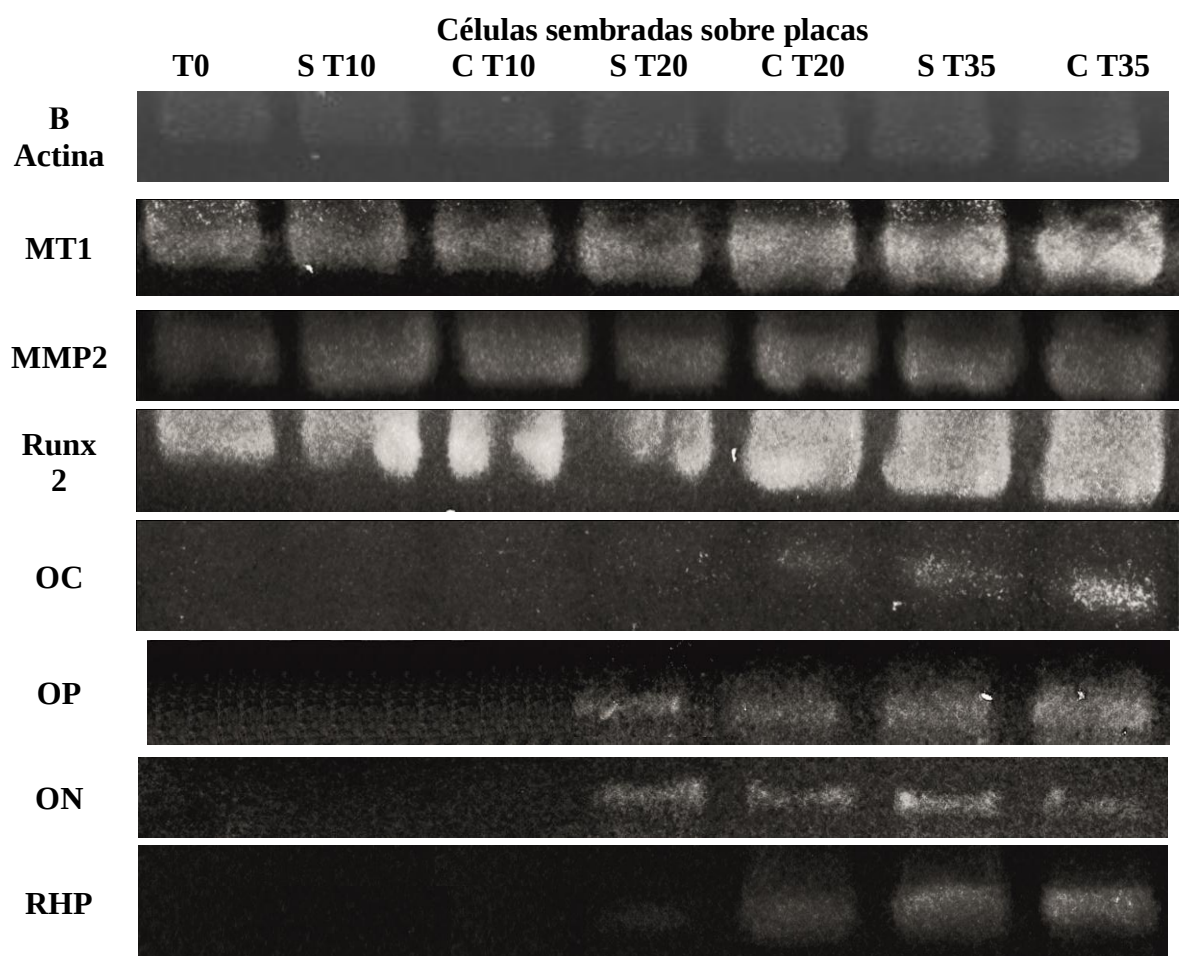


Figura 36. Marcadores moleculares para células sobre placa. Expresión de marcadores de diferenciación por medio de PCR. Células de la medula ósea de porcino sembradas sobre placa, evaluadas a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo en presencia (C) o ausencia (S) de inductores de diferenciación osteoblástica. Transcritos para MT1-MMP (MT1), MMP2, Runx2, Osteocalcina (OC), Osteopontina (OP), Osteonectina (ON) y receptor para la hormona paratiroidea (RHP). B-Actina como control positivo. Geles de agarosa al 1,2% en TAE 0,5x teñido con Bromuro de Etidio 0,5 [g/mL].

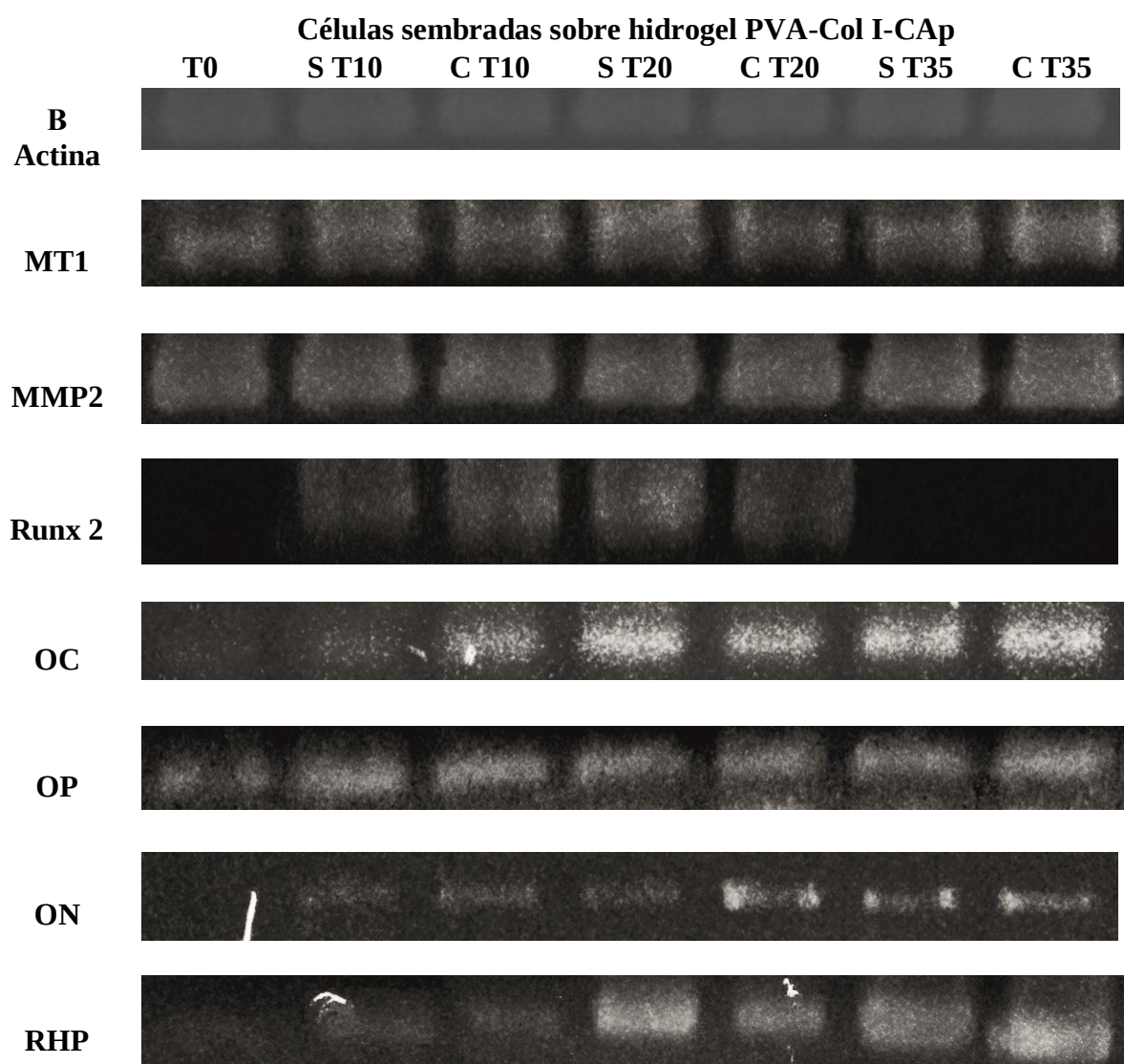


Figura 37. Marcadores moleculares para células sobre hidrogel. Expresión de marcadores de diferenciación por medio de PCR. Células de la medula ósea de porcino sembradas sobre el hidrogel PVA-Col I-CaP, evaluadas a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo en presencia (C) o ausencia (S) de inductores de diferenciación osteoblástica. Transcritos para MT1-MMP (MT1), MMP2, Runx2, Osteocalcina (OC), Osteopontina (OP), Osteonectina (ON) y receptor para la hormona paratiroidea (RHP). B-Actina como control positivo. Geles de agarosa al 1,2% en TAE 0,5x teñido con Bromuro de Etidio 0,5 [g/mL].

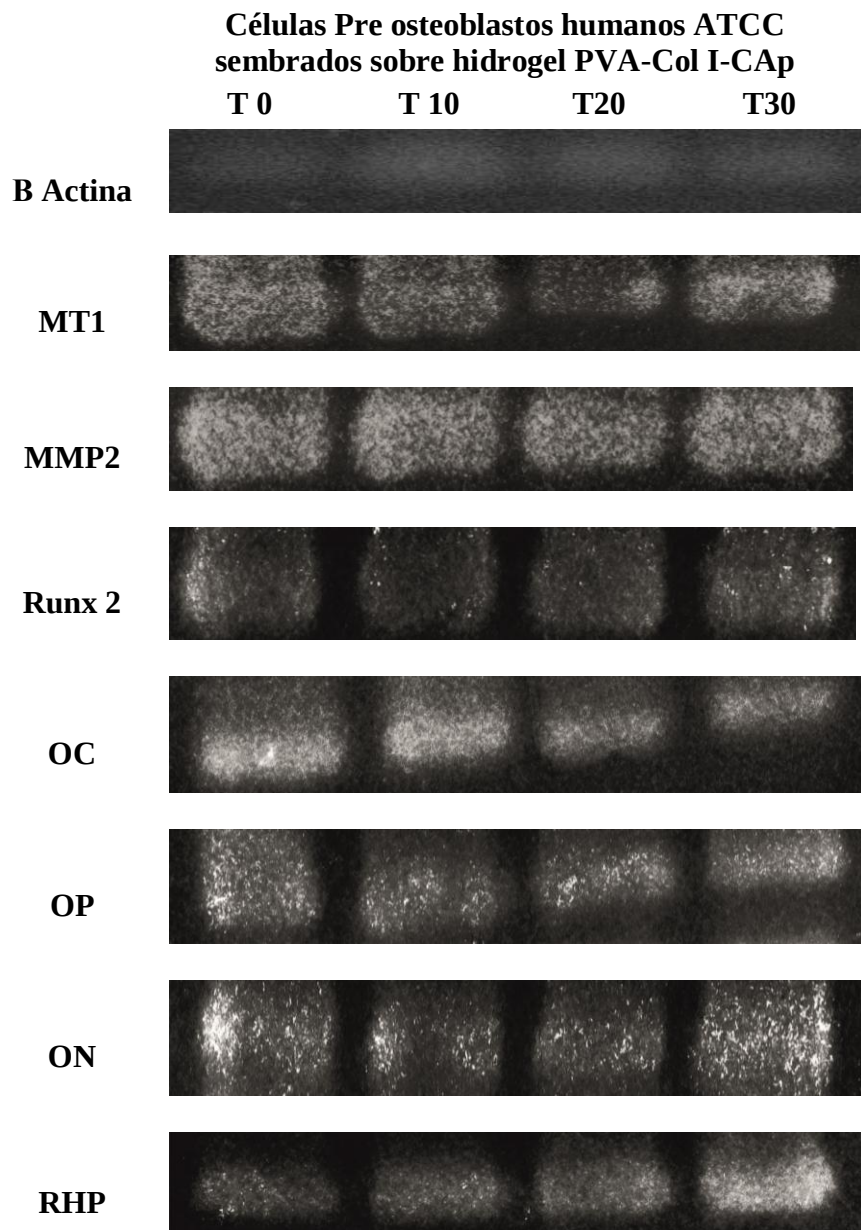


Figura 38. Marcadores moleculares para células pre-osteoblastos humanos ATCC. Expresión de marcadores de diferenciación por medio de PCR. Pre osteoblastos humanos ATCC sembrados sobre el hidrogel PVA-Col I-Cap, evaluadas a los 0, 10, 20 y 35 días de cultivo en presencia (C) o ausencia (S) de inductores de diferenciación osteoblástica. Transcritos para MT1-MMP (MT1), MMP2, Runx2, Osteocalcina (OC), Osteopontina (OP), Osteonectina (ON) y receptor para la hormona paratiroidea (RHP). B-Actina como control positivo. Geles de agarosa al 1,2% en TAE 0,5x teñido con Bromuro de Etidio 0,5 [g/mL].

6. DISCUSION

Las investigaciones en biomateriales para remplazo óseo siempre se han planteado hacia la necesidad de encontrar y desarrollar compuestos o mezclas de los mismos que imiten la estructura biológica y el comportamiento mecánico del hueso natural. Para esto se han hecho variados estudios con distintos componentes y sus mezclas arrojando distintos resultados; en particular se ha encontrado gran capacidad osteogénica en la mezcla de compuestos sintéticos como los polímeros que funcionarían como soporte estructural y compuestos orgánicos e inorgánicos que mimeticen los componentes naturales y asemejen la estructura, composición del hueso natural y de la matriz extracelular y para inducir la invasión y estabilización de las células.

El PVA es un polímero que ha sido ampliamente usado como soporte estructural de biomateriales con aplicaciones en la ingeniería de tejidos ya que posee buena resistencia mecánica, propiedades físicas deseables como elasticidad y alta capacidad de hidratación, es biocompatible, no presenta toxicidad, no es carcinogénico y ha sido usado en numerosos ensayos médicos. ((2) Hassan *et al.*, 2000; Bourke *et al* 2003; Wan *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2005; Buttini *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2012). Por otro lado el colágeno tipo I es el componente que se presenta en mayor proporción en la matriz extracelular y le provee flexibilidad y resistencia (Kher *et al.*, 2013) y por último la Apatita Carbonatada se ha probado solo en un trabajo como compuesto inorgánico en un biomaterial compuesto (Villamil, 2009) pero ya ha sido comprobada su superioridad frente a otras apatitas (Sakai *et al.*, 2012). La combinación de estos componentes busca incrementar las probabilidades de adhesión, proliferación y diferenciación de las células osteogénicas ofreciendo a las células un espacio con mayores beneficios que solo los materiales con recubrimiento o compuestos de un solo tipo, orgánico o inorgánico (Song *et al.*, 2012).

Los análisis se llevaron a cabo para poder escoger las mejores características y así desarrollar un hidrogel compuesto lo suficientemente estable por lo menos por 30 días que duraría el ensayo, pero lo ideal es que la duración sea proporcional al tiempo en que las células se diferencien y replacen el material por matriz extracelular natural. Este debe tener la capacidad de albergar células permitiendo su desarrollo y posterior diferenciación en la línea osteoblástica. Iniciando entonces con el PVA se encontró que los hidrogeles que sólo contenían PVA de bajo peso molecular no tenían la estabilidad deseada a pesar de ser tratados con diferentes técnicas de entrecruzamiento. Esto se puede deber al alto grado de hidrolisis del PVA de bajo peso molecular que se uso para este ensayo, lo que reduce su capacidad de establecer zonas de unión intermolecular (cristalites) y por tanto presenta alta solubilidad, consecuentemente su transición de gel a líquido ocurre de forma más

rápida. Hassan *et al.*, 2000 (1) sugirió que esto puede deberse al grado de hidrólisis del PVA lo que incrementa los grupos acetato presentes en la cadena polimérica, esto afectaría la capacidad de cristalización de PVA, de manera que sin muchos sitios de unión disponible el tratamiento de calor tiene poca o ninguna influencia en el PVA de alto grado de hidrólisis. Por esta razón se decidió hacer la mezcla con el PVA de alto peso molecular lo que resultó una mayor estabilidad del polímero en medio acuoso y por tanto mayor estabilidad de las muestras (por más de 30 días). No obstante, se encontró que al aumentar la concentración de PVA disminuían el tamaño de poro y su permeabilidad, demostrando una relación proporcional con el grado de hidrólisis del polímero y su capacidad de entrecruzarse en la mezcla.

Las soluciones de PVA fueron sometidas a la primera técnica de entrecruzamiento físico que fue el proceso de congelación y descongelación (C/DC). El PVA es un polímero fácil de entrecruzar por medios no químicos lo que impide que se generen intermediarios tóxicos durante el proceso y esto lo hace atractivo para aplicaciones médicas, especialmente en ingeniería de tejidos. Esta técnica también favorece la estabilidad de este tipo de hidrogeles, pues aumenta el entrecruzamiento intermolecular, retrasando a su vez la entrada en solución del polímero. La congelación hace que, en la solución las cadenas del polímero entren en contacto y por proximidad se formen interacciones secundarias no covalentes (enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas o interacciones dipolo-dipolo), estas aunque son uniones débiles se forman en gran proporción y su disposición a lo largo de la cadena polimérica da lugar a una estructura porosa entrecruzada muy compleja, excluyendo moléculas de agua. Cuando se da el proceso de descongelación estas interacciones se mantienen usando los dominios cristalinos del PVA como puntos de unión (Alves *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2012).

El éxito en el nivel de entrecruzamiento del hidrogel esta fuertemente ligado a las concentraciones de PVA y el incremento del peso molecular del mismo, generando una relación proporcional donde el aumento de la concentración de PVA es concomitante con el grado de entrecruzamiento (Stauffer *et al.*, 1992; Ru-yin *et al.*, 2008). Por esta misma razón, el aumento del número de ciclos consecutivos de C/DC también tiene un efecto al aumentar la formación de entrecruzamientos físicos como resultado de la cristalización del PVA. Es importante realizar más de 6 ciclos de C/DC ya que se sabe que después del primer ciclo de C/DC, el 50% de las cadenas del polímero se entrecruzan formando una red y después del sexto ciclo solo un 25% de las cadenas no se encuentran asociadas. Esta proporción mejora cuando la concentración de PVA de alto peso molecular aumenta, generando al mismo tiempo la disminución de la hidratación del hidrogel (menor

solubilidad). Las propiedades mecánicas del hidrogel también pueden ser controlados cambiando los parámetros de congelación como velocidad o tiempos del procedimiento (Alves *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2012).

Terminados los ciclos de C/DC las muestras se llevaron a una última congelación lenta, aislando las muestras del frío directo y haciendo que el efecto de la pérdida de calor dentro de las mismas indujera la formación de cristales de hielo de gran tamaño. Se sabe que entre mayor sea el tiempo de la pérdida de energía térmica de una mezcla caliente, mayores serán los volúmenes de los componentes aislados que se unan entre sí (ejemplo los minerales en el magma). En este caso los cristales de agua aumentan en volumen, lo que se traduce en aumento en el tamaño de los poros del hidrogel, después de sublimar las moléculas de agua (Stauffer *et al.*, 1992, y Ru-yin *et al.*, 2008).

Acto seguido, las muestras se liofilizaron para retirar el agua, lo que también se ha reportado como una manera de endurecer los hidrogeles incrementando su punto de fusión y previniendo que se fundan al someterlos a altas temperaturas (Bodugoz-Senturka *et al.*, 2008).

El siguiente paso para generar el entrecruzamiento fue el uso del tratamiento dehidrotermal (DHT). Se encontró que el uso de este método aumenta la estabilidad en los hidrogeles lo que lo hace ideal para la elaboración de los hidrogeles compuestos, donde la posibilidad de entrecruzamiento intermolecular del polímero se ve disminuida por la presencia de diversos iones. Se conoce que el retiro de agua de hidratación a nivel molecular (agua adsorbida) favorece las propiedades mecánicas del hidrogel al incrementar su cristalinidad (Bodugoz-Senturka *et al.*, 2008). Esta a su vez permitiría reforzar los entrecruzamientos ya formados a través de C/DC, aumentando la fuerza y estabilidad de las uniones previamente establecidas por pérdida de agua intermolecular adsorbida, lo que a su vez impide que los hidrogeles se solubilizan a una mayor velocidad. Cuando las áreas cristalinas entran en contacto con el medio acuoso y se da el proceso de hidratación estas sufren nuevas modificaciones donde los cristales con menos grosor lamelar (menores a 185 Å) se funden y los de mayor tamaño dan la estabilidad requerida (Hassan *et al.*, 2000; Bolto *et al.*, 2009).

La estrategia usada para obtener el tamaño de poro deseado, que en este caso fue la congelación lenta, presentó los resultados esperados mostrando en todos los tratamientos gran cantidad de poros los cuales se encuentran distribuidos al azar, su forma es alargada y amorfa. Esto sugiere que fueron formados por los cristales y claramente se ven interconectados. Esto es ventajoso ya que la interconexión de los poros permitirá una comunicación más eficiente de las células para los

procesos de diferenciación. De igual forma haber obtenido poros de tamaño mayor a $100\mu\text{m}$ es una ventaja ya que se reporta que el tamaño mínimo para permitir migración y transporte celular es de $100\mu\text{m}$, de igual forma se recomienda un tamaño de $300\mu\text{m}$ para permitir desarrollo óseo e invasión de capilares para ensayos *in vivo*. Aunque este no es el tamaño que se encuentra en mayor proporción, se encontraron algunos tratamientos que cuentan con poros que llegarían a este tamaño, lo que indica que los hidrogeles cumplen con el tamaño de los poros adecuado (Dadsetan *et al.*, 2008).

De igual forma no es conveniente que todos los poros tengan un tamaño superior a los $100\mu\text{m}$ ya que estudios han demostrado que la cantidad de células viables adherentes al hidrogel decrece con el incremento del tamaño del poro e incrementa de forma lineal con el área superficial del soporte (Murphy *et al.*, 2010; O'Brien *et al.*, 2005) evidenciando que tanto la adherencia celular como la viabilidad se ven favorecidos cuando el soporte tiene un tamaño de poro que oscila entre $95.9\text{--}150.5\ \mu\text{m}$. Además, estos parámetros no solo se verán afectados por el soporte sino también dependerán del tipo celular estudiado y el efecto que tengan las demás características del soporte sobre ellas (Kim *et al.*, 2007).

Los datos también sugieren que una forma de controlar el tamaño del poro es utilizar el tratamiento DHT. Todos los tratamientos evaluados mostraron que, al someter las muestras al horneado, reducían considerablemente el tamaño de poro obtenido inicialmente por los entrecruzamientos con los ciclos de C/DC. En las muestras no tratadas se pudieron ver burbujas en el interior demostrando una presencia de poros de mayor tamaño, mientras que, en concordancia con los resultados expuestos anteriormente, el horneado incrementa la capacidad de entrecruzamiento del PVA haciendo más estrecha la interacción entre las fibras y por consiguiente reduciendo el tamaño de los poros y la hidratación de las muestras.

El tamaño de poro puede verse afectado por distintas variables, una de ellas es emplear en solución altas concentraciones de PVA de alto peso molecular donde los poros reducen significativamente su tamaño. También se ha reportado que durante el tratamiento DHT el agua removida de los poros induce su colapso, esto puede conllevar a que el hidrogel de PVA se pliegue levemente y reduzca el tamaño de los poros (Bodugoz-Senturka *et al.*, 2008). En cuanto a la relación del tamaño de poro con la cantidad de ciclos de C/DC a los que son sometidas las muestras hay que tener en cuenta que aunque con pocos ciclos se obtienen poros más grandes, se pierde al mismo tiempo estabilidad del soporte como se explicó anteriormente. Guardando la proporción para el objetivo del trabajo entre

tamaño de poro y área para la adhesión celular se determinó entonces que el tratamiento indicado era la proporción 6:94 el cual posee el tamaño de poro indicado concordante con los valores recomendados en la literatura para el tipo de células que se espera manejar.

Las variables evaluadas son determinantes en la estabilidad del hidrogel en medios acuosos. Posterior a esto se realizaron los ensayos de solubilidad y los resultados obtenidos soportaron aún más los anteriores análisis. Se encontró que a mayor proporción de PVA de alto peso molecular en las muestras, mayor estabilidad de los hidrogeles durante los 30 días del ensayo. Esto se debe al mayor grado de entrecruzamiento que alcanzan las cadenas de PVA en comparación a los tratamientos con bajas proporciones de PVA de alto peso molecular. Esto concuerda con lo descrito en la literatura donde está reportado que el PVA polimerizado es altamente soluble en solventes polares como las soluciones acuosas y esta solubilidad es función del grado de polimerización y de hidrólisis del reactivo (Hassan *et al.*, 2000; Chiellini *et al.*, 2003). Los grupos hidroxilo presentes en el PVA contribuyen con la formación de puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares en las cadenas poliméricas, lo que reduce la solubilidad en agua.

También, se corrobora que el uso del tratamiento DHT es determinante en la estabilidad del hidrogel. Los no tratados se disolvieron casi en su totalidad o pierden forma y volumen, mientras que los tratados se mantienen en el tiempo gracias a que el PVA tiene un mayor grado de entrecruzamiento manteniendo la integridad de los hidrogeles y sugiriendo una mayor formación de cristales de PVA en las muestras. También se puede deber a la presencia de grupos residuales de acetato en el PVA parcialmente hidrolizado que debilitan los puentes de hidrógeno y emiten la solvatación a bajas temperaturas. De igual forma se vio con el tratamiento de entrecruzamiento con variados ciclos de C/DC que, entre mayor tiempo de entrecruzamiento, mayor la estabilidad de los hidrogeles en el tiempo. Esto se podría relacionar a que la tasa de disolución es más baja para las muestras tratadas con 7 ciclos de C/DC frente a las tratadas con 3 o 5 ciclos de C/DC y se podría explicar teniendo en cuenta que los tratamientos sometidos a una mayor cantidad de ciclos presentan un volumen de poro disminuido, 7 ciclos con 85.7% en comparación con 3 y 5 ciclos donde el porcentaje de porosidad es con 88.24 % y 88.14 % respectivamente (Wu *et al.*, 2005). En cuanto a la cristalinidad total del PVA se encontró una relación directamente proporcional donde a menores proporciones de PVA de alto peso molecular la cristalinidad es más baja y a medida que se aumenta la proporción, la cristalinidad total se aumenta igualmente. El tratamiento con DHT estabiliza los cristales formados en el entrecruzamiento con C/DC lo que hace aun más estables los hidrogeles tratados.

En el caso de los hidrogeles conteniendo mayor proporción de PVA de alto peso molecular, se espera una mayor cantidad de entrecruzamientos formados entre las cadenas a través de los grupos hidroxilo, haciendo más lenta la solvatación y disolución del hidrogel. El tratamiento DHT incrementa el grado de cristalinidad de los hidrogeles, pero esta sujeto a la presencia de grupos acetato lo que afecta la cristalización de forma directamente proporcional. Lo importante es hallar la relación de equilibrio entre todas estas variables para la elaboración del hidrogel final. Para los ensayos hechos en este trabajo la proporción 6:94 es la que presenta estabilidad por los 30 días no pierde la forma pero aún así es permeable y permite la hidratación.

Cuando se analizan los resultados cuantitativos de solubilidad, de los tratamientos que fueron sometidos al DHT, se demuestra que para el caso de estas muestras hay efecto dependiendo de la cantidad de ciclos a los que son sometidos los tratamientos y hay una relación positiva donde a mayor cantidad de ciclos, mayor formación de cristales y por consiguiente una menor cantidad de PVA que pasa a solución. Por el contrario no se ve efecto cuando se evalúa la variable de diferentes proporciones de PVA, esto se puede deber a que las proporciones son muy similares entre si lo que hace que no se presenten diferencias significativas para los tratamientos.

También se evaluó la tasa de hidratación y se encontró que los hidrogeles aumentan la toma del agua hasta el tratamiento 6:94 y luego el valor se reduce. Esto se debe a lo ya anteriormente discutido donde se sabe que para el caso de los tratamientos donde la baja proporción de PVA de alto peso molecular tienen una alta capacidad de hidratación lo que puede explicarse por la inestabilidad en los geles dada la baja cristalinidad y pequeño tamaño de cristal, que hace que las fibras se desintegren mas fácilmente ((2) Hassan *et al.*, 2000) mientras que cuando aumenta la proporción de PVA de alto peso molecular las interconexiones moleculares del polímero se hacen mas estrechas impidiendo la formación de poros de gran tamaño y por consiguiente reduciendo su hidratación (Bodugoz-Senturka *et al.*, 2008) Parece que los tratamientos de C/DC para este caso no suele ser relevante en cuanto a la capacidad de toma de agua de los hidrogeles ya que no hay marcadas diferencias significativas en los valores indicando que la diferencia entre los tratamientos en este caso es mínima y no se noto diferencia por el método usado para medirla, lo que si se encontró relevante fue que el tratamiento 6:94 presentó la mayor tasa de hidratación de todos los tratamientos lo que demostraría que es el tratamiento que tiene la mejor relación entre tamaño de poro, distribución de los mismos e interacciones del polímero para mantener la estabilidad deseada.

También se calculó para las muestras el porcentaje de porosidad y se encontró que para todos los tratamientos es mayor al 85%. Tener una proporción de porosidad tan elevada para todos los tratamientos una característica positiva, ya que mientras este valor no afecte la integridad y se logre que el hidrogel mantenga su estructura por el tiempo evaluado en un medio acuoso, entonces la invasión de células a través del soporte se favorecería y mejoraría la comunicación intercelular (Zeltinger *et al.*, 2001). A diferencia de lo analizado anteriormente, el porcentaje de porosidad no se ve afectado por la cantidad de ciclos de C/DC a los que son sometidas las muestras ni por la proporción de PVA evaluada. Esto va en relación con los resultados obtenidos donde se encontró que aunque el tamaño de poro varía, su proporción es inversamente proporcional, es decir, entre más grande el poro menor número de poros y cuando el tamaño disminuye hay mayor cantidad de los mismos. Esto mantiene la proporción. Esto también se puede deber a que todos los hidrogeles se prepararon con la misma concentración final de PVA, al 7% y a todos los tratamientos se les aplicó el mismo procedimiento para obtener la porosidad final.

En relación al tamaño de poro para el tratamiento que presenta mayor hidratación (proporción de PVA 6:94), para este se encontró que el rango de tamaño de poro menor a 161 μm tiene el mayor porcentaje encontrándose entre 67 a 81%. El rango de tamaño de poro entre 161 a 425 μm , tiene un porcentaje de volumen de poro entre 7.5 y 17% aproximadamente y por último el rango de tamaño de poro mayor a 425 μm mostro un volumen de poro de menos del 1.93%. Los valores obtenidos concuerdan con los parámetros requeridos para un soporte, donde el área superficial que esta en relación con el tamaño de poro y proporción del mismo, sea el adecuado para mantener la integridad estructural del hidrogel y las propiedades mecánicas básicas del soporte, lo que además favorece la adhesión celular (Alves *et al.*, 2011). Si estos valores fueran muy bajos harían difícil la intrusión celular, reducirían la capacidad para soportar una mayor cantidad de células y limitaría la difusión eficiente de los nutrientes (Alves *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2010)

Teniendo estos resultados se procedió a realizar los análisis de Difracción de Rayos X (XRD) en donde se evidenció que la formación de cristales en los diferentes tratamientos se mantiene en relación al patrón original del PVA (Alhosseini *et al.*, 2012) independiente de la proporción a la que sea evaluada el PVA. Al evaluar el patrón del difractograma se encontró un pico de mayor tamaño, este indica la fase cristalina de los hidrogeles de PVA. Se encontró que la intensidad del pico aumenta en relación al incremento en la proporción de PVA de alto peso molecular en las muestras, lo que podría indicar que la formación de cristales están en aumento. Lo mismo sucede cuando los ciclos de C/DC aumentan el pico se hace mas ancho, indicando entonces que tanto el aumento de la

proporción de PVA como los ciclos de C/DC tiene un efecto en la estructura cristalina del PVA, como se esperaba.

Para el caso de los resultados obtenidos en la prueba de espectro infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR) se obtiene inicialmente un patrón determinado para el PVA que concuerda con el reportado en la literatura (Minhas *et al.*, 2013). Cuando el PVA es modificado en los distintos tratamientos se encontró que hay efecto cuando los tratamientos son sometidos a diferente cantidad de ciclos de C/DC ya que los picos a 3300 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} y 1088 cm^{-1} se reducen en tamaño a medida que aumentan los ciclos de C/DC. Al mismo tiempo se puede ver un aumento en la intensidad de los picos a 1721 cm^{-1} y 1250 cm^{-1} relacionado con el mismo aumento en los ciclos de C/DC. Esto corrobora que el entrecruzamiento de las cadenas de PVA ocurre con el incremento de los ciclos C/DC. Por otro lado no se observaron cambios significativos al evaluar los tratamientos donde varía la proporción de PVA, los resultados obtenidos no muestran cambios en el patrón sin importar la proporción de PVA que se use; en todos los patrones obtenidos los picos principales se mantienen. Esto nos indica que los ciclos de C/DC si tienen un efecto en los cristales del PVA generando una restructuración molecular en las muestras alterando la vibración de las moléculas y los enlaces que componen y por consiguiente su consistencia en el medio acuoso, mientras que las proporciones de PVA estructuralmente no parecen tener un efecto marcado, (Song *et al.*, 2012).

En el caso del hidrogel de proporción 6:94 de PVA en relación con los ciclos de C/DC los datos obtenidos en el ensayo de FTIR no revelan cambios en el entrecruzamiento de los hidrogeles, pero si un incremento en el grado de cristalinidad y tamaño del cristal con el incremento de los ciclos de C/DC, lo que indica que estas dos ultimas características juegan un papel un importante en la hidratación y degradación de los hidrogeles.

Como último ensayo se evaluaron los termogramas de DSC en donde se encontró que el porcentaje de cristalinidad se ve afectado por la proporción de PVA, cuando estos se comparan con el termograma del PVA sin tratamientos (Minhas *et al.*, 2013) Los valores obtenidos se incrementan hasta llegar a un pico en el tratamiento 6:94 y luego disminuyen. Se puede ver también que a medida que se incrementan los ciclos de C/DC se aumenta la cristalinidad de las muestras en algunos tratamientos. En el tratamiento que presenta el mayor porcentaje de cristalinidad, el 6:94, se puede ver este efecto con los valores obtenidos en el ensayo de 1.77%, 3.12 % y 4.68% para 3, 5 y 7 ciclos de C/DC respectivamente. Esto indica que la cristalinidad se incrementa en relación positiva, pero esta relación de proporción directa no se observó en todas las mezclas de PVA. Así, la mezcla

8:92 o el 10:90 no la presentan. Esto se puede deber al equilibrio que debe existir entre la proporción de PVA de alto y bajo peso molecular en la muestra y la cantidad de ciclos de C/DC que son aplicados a la misma como se ha mostrado en los resultados anteriores.

La cristalinidad aumentó para el tratamiento que ha presentado el mejor comportamiento a lo largo de los ensayos (proporción de PVA 6:94). Para el cálculo el tamaño de los cristales formados se encontró este depende de la cantidad de ciclos de C/DC a los que son sometidas las muestras, donde según el tratamiento los tamaños van variando. Se encontró que entre menos ciclos (3x) los cristales, a baja concentración de PVA de alto peso molecular, disminuyen de tamaño y luego, cuando la proporción de PVA aumenta, el tamaño de los cristales también. Por el contrario se presenta el efecto inverso para la mayor cantidad de ciclos (7x) donde a baja concentración de PVA de alto peso molecular, el tamaño de los cristales es elevado y luego, cuando la proporción de PVA aumenta, el tamaño de los cristales disminuye. Para las muestras tratadas con 5 ciclos se mantiene estable sin importar la proporción de PVA evaluado.

Con respecto a los datos obtenidos para el tamaño de los cristales y teniendo en cuenta que se buscó el tratamiento con el mayor grado de cristalinidad. Se puede decir que los tratamientos que alcanzaron los más altos tamaños de cristal son los tratados con 3 ciclos a muy alta o muy baja concentración de PVA de alto peso molecular, pero en estos tratamientos se encuentran limitaciones de estabilidad o del tamaño de los poros como lo vimos anteriormente. El otro tratamiento que también presenta un tamaño elevado de los cristales es el correspondiente a 7 ciclos de C/DC en la proporción 6:94 que parece ser el tratamiento ideal en este caso pues se destacó a lo largo de todos los ensayos realizados.

Basados en los resultados obtenidos y todo lo discutido anteriormente se escogió la proporción 6:94 con 7 ciclos de C/DC para preparar el compuesto de PVA-Colágeno-CAP. Se procedió entonces a preparar los hidrogeles de PVA + cristales de Apatita Carbonatada (CAP). Generar una buena proporción entre el hidrogel planteado y los cristales de apatita es importante. Una concentración muy elevada haría que sea difícil su suspensión, esto concuerda con lo reportado en la literatura, donde se indica que la fase cristalina del PVA disminuye cuando están presentes en la mezcla los cristales de apatita (Degirmenbasi *et al.*, 2006), esto puede ser sugerido debido a la naturaleza polar del PVA que facilita una fuerte interacción entre la hidroxiapatita y el PVA suprimiendo la cristalinidad al reducir los grupos OH del PVA disponibles para la formación de puentes de hidrógeno a nivel intra e intermolecular en el polímero. La HA puede formar enlaces de

hidrógeno con el PVA y el colágeno o establecer interacciones tipo $[\text{OH}^-]-\text{Ca}^{2+}-[\text{OH}^-]$ (Chul *et al.*, 2003) que eventualmente podrían establecerse también con el CAp. Si estas interacciones ocurren en gran cantidad y la cristalinidad del hidrogel se reduce se perderían muchas propiedades ya escogidas para este hidrogel.

Al mismo tiempo la proporción de CAp en el hidrogel no debe ser poca ya que no se generaría el efecto inductor que se pretende en las células, así se analizó entonces las proporciones 0,6%, 0,8%, 1% y 1,2% y se encontró que al disgregar bien las partículas de CAp estas concentraciones se mantenían suspendidas por algún tiempo. Al evaluar las diferentes concentraciones de Citrato de sodio propuestas se encontró que la concentración mas baja (4mM) logró mantener por mas de 24 horas suspendida la proporción 0,6% de CAp. Por esta razón se decidió tomar esta concentración para trabajar. Aunque la concentración de CAp no es muy alta si se mantuvo suspendida el tiempo requerido durante la congelación lo que garantiza que los cristales de CAp estarán suspendidos en el hidrogel de forma uniforme. Esto es de importancia ya que así se garantiza dar las mismas condiciones a todas las células en el ensayo y permitirá que el efecto inductivo en las células se vea de forma más clara.

Para el compuesto final del hidrogel se realizó primero su aislamiento y caracterización. Se comprobó que extraer colágeno tipo I de la piel del bovino es posible y relativamente sencillo. El producto obtenido se cuantificó por medio de la técnica Bradford y se encontró que la solución final se encontraba a una concentración de $0,187\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el colágeno extraído. Al realizar corrido electroforético del colágeno extraído junto con el control positivo (Colágeno tipo I Sigma) se encontró que ambas muestras presentan el mismo patrón de corrido y se evidencian las mismas bandas. Se pueden ver todas las posibles estructuras que forman corresponde a los trímeros, los dímeros y los monómeros de las cadenas de colágeno a lo largo del corrido que corresponden a las mismas reportadas en la literatura (Cliché *et al.*, 2003). Además se realizó una inmunotinción a través de la técnica Dot Blot donde se observó claramente la misma reacción tanto para el control positivo como en la muestra extraída. Estos dos resultados indican que el colágeno extraído si corresponde a Colágeno tipo I. Este se uso a una concentración de final de 0,8% (Villamil, 2009).

Cuando ya se encontró que componentes tendría el hidrogel compuesto y en que proporción, se realizó el hidrogel para el ensayo con el cultivo celular, se preparó un hidrogel PVA 6:94, Colágeno 0,8% y CAp 0.6% donde se mezcló inicialmente entre PVA y CAp para realizar los ciclos de congelación y descongelación, esto se hizo sin que el colágeno estuviera presente ya que se quería

evitar el daño de las fibras del colágeno por efecto de los cristales en las repetidas congelaciones, así como evitar la degradación del mismo por la aplicación de calor a la muestra en el proceso de descongelación. Finalizados los ciclos de C/DC se adicionó el colágeno y se completo la mezcla y el proceso de congelación final se hizo lento para que al igual que los ensayos preliminares se garantizara el mayor tamaño de poro posible. En estas muestras se realizó el proceso de liofilización y el tratamiento DHT como se había acordado previamente.

Estos hidrogeles finales fueron nuevamente analizados y se encontró que la mezcla no modificaba la estructura original del PVA y por consiguiente este mantenía las propiedades ya seleccionadas. Por medio de la técnica de Microscopia electrónica de barrido se evidenció que el tamaño de los poros se mantenía mayor a $100\mu\text{m}$ y la forma y disposición de los poros no se modificó. Los análisis de XRD no evidenciaron cambios en el patrón obtenido previamente. La presencia del pico de Apatita carbonatada (CAp) en el difractograma revela que CAp se incorporó en el hidrogel correctamente. Los análisis para FTIR muestran vibración en todos los picos acostumbrados pero con menor intensidad en el hidrogel compuesto que en el hidrogel de PVA, excepto el pico de amida II a 1573 cm^{-1} el cual aumenta la intensidad. Esto indicaría que estaría ocurriendo un entrecruzamiento entre el colágeno y las fibras poliméricas de PVA. Para el caso de los valores de cristalinidad, el incremento del valor T_m , el del grado de cristalinidad y el tamaño del cristal de PVA confirman lo anteriormente dicho. Se evidenció que la tasa de hidratación (Q) para el hidrogel PVA-Col I-CAp fue menor que para el PVA solo 4.96 ± 0.43 y 7.05 ± 0.14 , respectivamente. Un incremento en el entrecruzamiento afecta la cinética de hidratación del hidrogel compuesto, pues el incremento en el entrecruzamiento reduce el grado de hidratación de las fibras poliméricas (Varshosaz *et al.*, 2002)

Plateado el protocolo para la preparación del hidrogel, se procedió a evaluar su biocompatibilidad a través del cultivo células de la medula ósea. Se utilizaron células provenientes de aspirados de la cresta iliaca de porcinos de 4 meses de edad, previamente establecidas y caracterizadas en el laboratorio (Carretero *et al.*, 2009). La preparación y selección de las células utilizadas en este ensayo concuerda con lo citado en la literatura, donde se recomienda separar las células obtenidas de los aspirados por gradientes de densidad, la fase obtenida debe sembrarse y a partir de la habilidad que tengan algunas de esta para adherirse, se seleccionan la población a trabajar, estas células son las reportadas con capacidad para diferenciarse a osteoblastos (Jaquierey, *et al.*, 2005). Además las células de la medula ósea son atractivas para este tipo de ensayos ya que contienen grupos celulares fenotípicos y funcionalmente diversos, que soportan colectivamente la

hematopoyesis y la osteogénesis, dentro de las cuales se encuentran células osteoprogenitoras (Encina *et al.*, 1999).

Al evaluar *in vitro*, la propiedad osteoconductiva de la matriz de PVA-Col I-CAp seleccionada, se encontró que la matriz permitió la adherencia y proliferación celular. La matriz también permitió la adherencia e proliferación para otro tipo de células como la línea de pre-osteoblastos humanos y la línea de células VERO, lo cual sugiere que la matriz podría ser biocompatible, no solo con osteoblastos sino con otro tipo de células. Esto podría estar relacionado con la presencia de las fibras de colágeno incluidas en la matriz con las cuales estén interactuando las células, demostraron que las células fibroblastoides tienen capacidad para anclarse directamente a colágeno en su forma nativa, o sobre fibras de colágeno desnaturalizado (Schor *et al.*, 1979). La forma inicial en todos los cultivos es de tipo fibroblastoide pero va cambiando a cúbica en los tratamientos inducidos con factores de diferenciación, las no inducidas también cambian su morfología en los últimos tiempos del ensayo pero esto se debe a un efecto de diferenciación inducido por la densidad celular.

Las tinciones de las células en la matriz permitieron comprobar que las células además de adherirse al material, son capaces de invadir los poros y distribuirse desde la superficie hasta el interior del hidrogel. Con el tiempo pueden verse agrupaciones celulares dentro de los poros, lo que sugiere el inicio de la diferenciación celular. No se evidencia una diferencia significativa entre las células tratadas con factores de diferenciación y las que si fueron tratadas con estos. Esto indica que el hidrogel permite que las células sean tratadas con diferentes factores sin un efecto adverso y que por si solo el material potencia un desarrollo similar al que se da en las células inducidas con factores de diferenciación y al mismo tiempo parece incrementar el efecto en los cultivos tratados con los mismos. Esto se puede deber a la inclusión de cristales de CAp, que al generar un ambiente similar al del tejido óseo pueden inducir un efecto de diferenciación (Lee *et al.*, 2013).

Los análisis realizados para las células adheridas sobre el material por medio de la técnica SEM demostraron que las células dentro de los poros están adheridas al material y que el tamaño de los poros permite que las células ingresen en el mismo y se establezcan en los espacios vacíos. Con este análisis se corrobora lo visto con las técnicas de tinción.

Se demostró también que los hidrogeles permiten la proliferación celular, cuando se comparan las células sobre placa y las células cultivadas sobre el hidrogel, identificándose curvas de crecimiento similares, revelando que el hidrogel no interfiere en la proliferación natural de las células. La misma

capacidad proliferativa se vio para las células control. En algunos casos, sobre todo en los tratamientos de células con factores, se vio una reducción en la proliferación a los 35 días. Esto concuerda con la literatura donde se afirma que las células que entran en diferenciación reducen notablemente su tasa proliferativa (Gronthos *et al.*, 2001). Al comparar el número de células de la médula ósea con el control de pre-osteoblastos humanos, ambos tratamientos sembrados en la matriz PVA-Col I-CAp, no se aprecian diferencias en el patrón de crecimiento

En las gráficas se puede ver que el número de células presentes en las placas es, en general, mayor a las que se ven en los hidrogeles PVA-Col I-CAp; aunque los hidrogeles tienen una mayor área para que las células proliferen en mayor cantidad. Hay que tener en cuenta que la técnica usada para conteo celular ha presentado limitaciones cuando se usa para cuantificación sobre el material. En trabajos anteriores se evidenció que CAp tiende a retener por absorción las moléculas (4-nitrofenol, MTT, RNA, etc.) liberadas por la actividad enzimática o por extracción en la determinación por métodos enzimáticos colorimétricos (Carretero *et al.*, 2009), se cree entonces que los datos obtenidos podrían presentar una reducción frente al dato que originalmente la célula esta expresando. Esto podría explicar por qué se presenta tanta diferencia entre los datos obtenidos sobre la placa y los que se determinan sobre el hidrogel. Otra opción es que la actividad reportada sobre en los hidrogeles corresponda únicamente o mayoritariamente a las células mas superficiales y no a aquellas dentro de la porosidad de los hidrogeles. De igual forma las células se mantienen vivas y por ahora solo se puede asegurar que se proliferan aunque de forma limitada durante el ensayo para todos los tratamientos evaluados lo que indica que la matriz PVA-Col I-CAp no parece ser citotóxica o tener un efecto adverso sobre la adhesión y crecimiento del cultivo primario de células de la médula ósea porcino ni sobre líneas celulares establecidas, estuvieran estas comprometidas o no con el linaje osteoblástico, sugiriendo biocompatibilidad no solo con células de médula ósea sino con otro tipo de células.

Con los resultados obtenidos se comprobó la capacidad osteoconductiva de la matriz PVA-Col I-CAp. La capacidad osteoinductiva en el material se evidencio inicialmente cuando se analizaron las fotos de la técnica SEM para verificar la adhesión celular. En los cultivos sobre el hidrogel se encontró que las células que han sido tratadas con factores de inducción a partir del día 20 aproximadamente presentan unos precipitados electrodensos en la matriz extracelular lo que podría indicarse como la posible deposición de cristales de calcio por parte de las células. Estos mismos depósitos se encontraron para las células de la médula ósea sembradas sobre el hidrogel pero que no habían sido tratadas con factores de inducción, la diferencia de estos depósitos entre estos dos

tratamientos mencionados es que en las células que no fueron tratadas con factores los depósitos son encontrados con una menor frecuencia y estos son de tamaño más reducido. A los 35 días los depósitos tanto para las células inducidas como para las que no, fueron encontrados de tamaño similar y al compararlas con las células del control positivo demuestran que las células de la médula ósea si están siendo inducidas a la diferenciación, aún sin inductores, lo que indica que la matriz compuesta es la responsable de dicha inducción.

Seguido a esto se analizaron los marcadores para recoger mas evidencia de que las células están siendo inducidas en la línea osteoblástica. Para esto se evaluó la actividad fosfatasa alcalina la cual esta ligada a membrana y es ampliamente reconocida como uno de los marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica. Se encontró que la actividad para las células sobre placa no hay diferencias significativas al ser o no inducidas a diferenciación. La actividad presenta un pico entre los 10 y los 20 días y luego se reduce casi al mínimo de expresión a los 35 días. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cheng *et al.*, 1994 quien encontró que la ALP puede suprimirse luego de tres semanas de cultivo en células stem mesenquimales humanas tratadas con dexametasona. Para el caso de las células sembradas sobre los hidrogeles la diferencia es más marcada y se ve una mayor expresión para las células que fueron tratadas con inductores de diferenciación. Esto se puede deber a que el material junto con los inductores tiene un efecto positivo en la expresión de este marcador. Concuerda con lo reportado en la literatura donde las células aisladas de médula ósea o comprometidas en el linaje osteogénico comúnmente presentan niveles altos de ALP asociados al fenotipo osteoblástico (Encina *et al.*, 1999).

Por el contrario el hecho de que la actividad se vea reducida en el caso de las células no inducidas no tiene ningún efecto negativo en la deposición de nódulos de calcio en la matriz extracelular, como se mostro anteriormente. Algunos autores reportan que no es necesario que haya correlación entre niveles altos de expresión de ALP y la formación de matriz mineralizada mientras (Houston *et al.*, 2004). Cuando se comparan las células de la medula ósea sobre el hidrogel inducida con factores y las células control positivo pre-osteoblastos humanos de ATCC no se encuentran diferencias significativas lo que indica el hidrogel PVA-Col I-CAp induce a la expresión de la ALP cuando las células son tratadas con inductores de diferenciación e igual no impide su expresión cuando las células no son tratadas con los inductores. En general el hidrogel como soporte del cultivo no afecta negativamente la expresión del marcador ALP durante la inducción de células de médula ósea de porcino hacia osteoblastogénesis. La expresión de ALP para todos los tratamientos en general es la esperada para este tipo de células (Carretero *et al.*, 2009).

Luego se evaluó la aparición de nuevos depósitos de calcio por medio de la técnica del Xilenol Orange y se encontró que el hidrogel por si solo presenta una pequeña pigmentación correspondiente a los cristales de CAp incluidos en el material pero que no fue relevante para los resultados obtenidos. Ya en los tratamientos con células se encontró que las células inducidas con factores presentan gran cantidad de depósitos de calcio a los 20 y los 35 días, y al ser comparadas con las células pre-osteoblastos humanos de ATCC no se ve diferencia aparente entre los tratamientos lo que indica que el hidrogel no evita que las células entren en la línea osteoblástica y generen depósitos nuevos de calcio en la matriz extracelular. Al analizar las células que no fueron inducidas con factores de diferenciación se encontró que a los 20 días tienen algunos depósitos de calcio ya evidentes pero a los 35 días estos han aumentado considerablemente en tamaño y cantidad haciendo que no hayan diferencias considerables entre las células de la médula ósea sin inducción y las células del mismo tipo inducidas o con el control positivo lo que asegura que el material si esta induciendo a las células a entrar en la línea de diferenciación osteoblástica. Por el contrario, las células VERO usadas como control negativo para la tinción de matriz celular calcificada, no fueron las mejores como control ya que muestran fluorescencia verde-amarilla o naranja amarilla a los 20 días de cultivo.

Por ultimo se analizaron los marcadores de diferenciación osteoblástica. Para determinar si la matriz de PVA-Col I-CAp permitía que las células de médula ósea y la línea de pre-osteoblastos ATCC (control positivo) en proceso de diferenciación a osteoblastos transcribieran genes relacionados con el linaje osteoblástico y que el soporte no afecta la capacidad de dicho modelo para codificar para proteínas presentes e importantes en la matriz ósea, se determinaron por RT-PCR la presencia de algunos transcritos específicos, los marcadores evaluados para este estudio en su mayoría ya habían sido evaluados en estudios anteriores (Carretero *et al.*, 2009; Villamil, 2009) y se encontró que para los marcadores MT1-MMP, MMP-2, que son factores que determinan la expresión de metaloproteinasas que se expresarían cuando las células inician migración a través de la matriz para formar agrupaciones celulares características para la formación de nódulos de mineralización. Se encontró que se expresan para todos los tiempos en todos los tratamientos así como en el control positivo de células pre-osteoblastos humanos ATCC lo que indica que el hidrogel no impide o limita la expresión de estos dos marcadores moleculares y comprueba que el hidrogel permite la diferenciación celular hacia la línea osteoblástica y en este caso permite la migración celular.

Los transcritos de osteopontina, marcador relacionado con la reparación ósea y regulación de la angiogénesis (Duvall *et al.*, 2007), con la adherencia de osteoblastos, fibroblastos y osteoclastos a la matriz mineralizada ya que contiene motivos arginina-glicina-aspartato (RGD) que interactúan con varios tipos de integrinas (Yamate *et al.*, 1997) y se ha asociado con la respuesta de osteoblastos a estímulos mecánicos (Morinobu *et al.*, 2003). Y la osteonectina marcador que se ha determinado como una proteína que en unión con colágeno puede ligar cristales de apatita y iones de calcio libres y se ha sugerido su importancia en la nucleación de la deposición de la fase mineral (Boskey *et al.*, 2003). La expresión de estos dos marcadores en la línea celular en comparación con el cultivo primario es consecuencia del estadio más avanzado en la osteogénesis de la línea respecto del cultivo primario. Ambos marcadores se expresaron de la misma forma, se encontró que se expresa para las células sobre placa a partir de los 10 días de cultivo con factores y es constante hasta terminar el ensayo, mientras que las células sobre el hidrogel ya se ve su expresión desde los 10 días sin factores lo que determina una inducción positiva por parte de la matriz de soporte. Estos marcadores para el cultivo de pre-osteoblastos de la línea ATCC se evidenciaron en todos los días de cultivo.

Por otro lado, los transcritos para osteocalcina, una proteína expresada y secretada casi exclusivamente por células osteoblásticas en estados tardíos de maduración, se encontró que para las células sobre placa su expresión inició a partir de las células tratadas con factores a los 20 días de cultivo, mientras que en el hidrogel su expresión inicia desde los 10 días sin factores de forma muy leve y 10 días con factores de forma clara, lo que podría indicar que el hidrogel generó un efecto positivo sobre la expresión en tiempos mas tempranos para este marcador. Para los pre-osteoblastos de la línea ATCC, mostraron para este transcrito en todos los tiempos analizados. En el caso de los transcritos para el receptor de la hormona paratiroidea la cual se expresa en distintos tejidos pero su nivel de expresión es particularmente notable en hueso y es importante en la homeóstasis de calcio (Gensurea *et al.*, 2005). Según Bos *et al.*, (1996) la expresión de RHP en cultivo primario de calvaria de fetos de rata está fuertemente correlacionada con la expresión de osteocalcina pero menos con la de fosfatasa alcalina, lo que indica que es el osteoblasto maduro quien expresa RHP (Yamauch *et al.*, 1997). Se detectaron en las células de médula ósea sobre las placas donde se ve que se expresa levemente desde los 10 días y se hace más clara a los 20 pero a los 35 días solo se expresa en las células sin factores. Para las células sobre el hidrogel su expresión se hace más fuerte y contante desde los 10 días sin factores. Para los pre-osteoblastos de la línea ATCC mostraron para este transcrito en todos los tiempos analizados.

Finalmente se analizó la expresión de Runx 2 el cual según lo descrito en la literatura es uno de los primeros genes que dan inicio y que comprometen a la células con la línea osteogénica, como gen maestro que regula la expresión de los demás los genes corriente abajo en la línea osteogénica (Anselme, 2000; Ducky *et al.*, 2000; Kofron *et al.*, 2006; Lian, 2006). Para las células sembradas sobre placa su expresión inicia a los 10 días sin factores y se mantiene en todo el ensayo mientras que sobre el hidrogel solo se expresa a los 10 y a los 20 días de cultivo lo que indica que el hidrogel esta regulando la expresión de la cascada de diferenciación. Para los pre-osteoblastos de la línea ATCC mostraron para este transcrito en todos los tiempos analizados.

7. CONCLUSIONES

- El uso de la proporción 6:94 de PVA de alto y bajo peso molecular respectivamente, permite obtener un hidrogel insoluble en medio acuoso por un tiempo mínimo de 35 días presentando un tamaño de poro esperado superior a 100 μ m.
- Someter los hidrogeles a ciclos de congelación y descongelación genera entrecruzamiento físico del polímero lo que se vio reflejado en un cambio en la cristalización y el tiempo de estabilidad en medio acuoso por 35 días.
- El uso del tratamiento dehidrotermal mejora la estabilidad de los hidrogeles en medio acuoso.
- Someter las muestras a un mayor número de ciclos de congelación y descongelación disminuyó la velocidad de disolución de las muestras, efecto que no es del todo claro para las diferentes proporciones de PVA evaluadas.
- Los hidrogeles analizados presentaron una porosidad superior al 85%. El tratamiento PVA 6:94 presentó la mayor tasa de hidratación y mostró los cristales de mayor tamaño (50 Å).
- Las células aisladas de la médula ósea de porcino pueden expresar un fenotipo similar a osteoblastos cuando son cultivados en hidrogeles de PVA-Col I-CAp en presencia de factores de inducción a la diferenciación.
- Se encontró que el hidrogel compuesto de PVA 6:94, Colágeno I 0,8% y CAp 0.6% acompañado de ciclos de C/DC y DHT permiten obtener hidrogeles con el tamaño de poro esperado y la estructura física de la matriz obtenida en el tratamiento PVA 6:94 insolubles durante los 35 días de evaluación del cultivo.
- Se pudo determinar el potencial osteoconductor de hidrogel PVA-Col I-CAp ya que permitió la adherencia y proliferación de las células aisladas de la médula ósea y de otras líneas ATCC.
- Se sugiere que el hidrogel de PVA-Col I-CAp podría tener un potencial osteoinductivo ya que expresa transcritos correspondientes a la línea de diferenciación osteoblástica y evidencia la aparición de lo que parecen ser nuevos depósitos de calcio en la matriz extracelular.

8. RECOMENDACIONES

- Caracterizar físicamente los hidrogeles preparados en este estudio, determinando propiedades mecánicas como resistencia y elasticidad (pruebas de compresión, de ruptura, carga mecánica, etc.), los cuales no fueron incluidos en este estudio
- Estudiar composiciones mas altas de CAp procurando no alterar las propiedades físicas ya obtenidas en este trabajo pero buscando una mayor proporción del cristal en las muestras y evaluar su incidencia en el crecimiento y diferenciación de células osteoblásticas.
- Buscar una técnica más apropiada para el conteo de células sobre los hidrogeles ya que la usada actualmente no refleja los datos de forma confiable.
- Realizar pruebas mas concluyentes para determinar la capacidad osteoinductiva de la matriz de PVA-Col I-CAp
- Caracterizar la población celular por medio de citometría ya que los cultivos se inicia a partir de una mezcla de células, y las proporciones de estas otras poblaciones celulares pueden estar generando un efecto en el desarrollo y comportamiento del cultivo evaluado.
- Hacer estudios *in vivo* ectópicos o en remplazo óseo para evaluar el desempeño del hidrogel seleccionado.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Adhikari, S. and Banerji, P. 2009. Polyaniline composite by in situ polymerization on a swollen PVA gel. *Synthetic Metals* 159: 2519–2524
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition. Garland Science. New York. USA. Pp.1300-1311.
3. Alhosseini, S.N., Moztaarzadeh, F., Mozafari, M., Asgari, S., Dodel, M., Samadikuchaksaraei, A., Kargozar, S. and Jalali, N. 2012. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 25–34
4. Alves, M.-H., Jensen, B. E., Smith, A.A. and Zelikin, A. N. 2011. Poly(Vinyl Alcohol) Physical Hydrogels: New Vista on a Long Serving Biomaterial Macromol. Biosci., 11, 1293–1313
5. Amini, A.R., Laurencin, C.T., Nukavarapu, S.P. 2012. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 40(5):363-408.
6. Anselme, K. 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21 667-681.
7. Asran, Sh., Henning, S., Michler, G. 2010. Polyvinyl alcohol–collagen–hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer* 51: 868–876.
8. Bajpai, K. & Saini, R. 2006. Preparation and characterization of novel biocompatible cryogels of poly (vinyl alcohol) and egg-albumin and their water sorption study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17: 49- 61.
9. Beniker, D., McQuillan, D., Livesey, S., Urban, R.M., Turner, T.M., Blum, B., *et al.* 2003. The use of a cellular dermal matrix as a scaffold for periosteum replacement. *Orthopedics* 26. May supplement. En <http://www.orthosupersite.com/view.asp?rID=2332>. Consultado el 13 de Agosto de 2008.
10. Benoit, W., Durney, R., Anseth, S. 2006. Manipulations in hydrogel degradation behavior enhance osteoblast function and mineralized tissue formation. *Tissue Engineering* 12: 1663 -1673.
11. Bodugoz-Senturka, H., Choia, J., Orala, E., Kunga, H., Maciasa, E., Braithwaite, G. and Muratoglu, K. 2008. The effect of polyethylene glycol on the stability of pores in polyvinyl alcohol hydrogels during annealing. *Biomaterials*. 29:141–149.
12. Bolto, B., Tran, T., Hoang, M. and Xie, Z.L. 2009. Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes. *Progress in Polymer Science*. 34: 969–981
13. Bonzani, I., George, J., Stevens, M. 2006. Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Current Opinion in Chemical Biology* 10: 568–575.
14. Bos, P., van der Meer, J., Feyen, J. & Herrmann, M. 1996. Expression of the parathyroid hormone receptor and correlation with other osteoblastic parameters in fetal rat osteoblasts. *Calcified Tissue International*. 58:2.
15. Boskey, A.L., Moore, D., Amling, M., Canalis, E., Delany, A. M. 2003. Infrared Analysis of the Mineral and Matrix in Bones of Osteonectin-Null Mice and Their Wildtype Controls. *Journal of Bone and Mineral Research*. 18: 1005–1011.

16. Bourke, S.L. Al-Khalili, M. Briggs, T. Michniak, B.B. Kohn, J. and Poole-Warren, L.A. 2003. A Photo-Crosslinked Poly(vinyl Alcohol) Hydrogel Growth Factor Release Vehicle for Wound Healing Applications. *AAPS PharmSci* , 5 (4): 1-11
17. Brydone, A.S. Meek, D. and MacLaine, S. 2010. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Journal of Engineering in Medicine*. 224: 1329 – 1343
18. Buttini, F. Soltani, A. Colombo, P. Marriott, C. Jones, S.A. 2008. Multilayer PVA adsorption onto hydrophobic drug substrates to engineer drug-rich microparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33: 20–28
19. Carretero, C., Bernal, C., Torres, M.L., Thevi, J.K., Zakaria, F.A., Mikan, J. 2009. Evaluación de la biocompatibilidad de apatita carbonatada de síntesis seca por medio del cultivo de células osteoprogenitoras de porcino. *Revista Med* 17: 231-244.
20. Carretero, C. 2009. Cultivo *in vitro* de células de linaje osteogénico provenientes de médula ósea de porcino para evaluación de Apatita Carbonatada de síntesis seca. Tesis de Grado. Bogota. Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias, Facultad de Medicina.
21. Carvalho, S., Kostenuik, J., Salihi, E., Bumann, A., Gerstenfeld, C. 2003. Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression. *Matrix Biology* 22 :241-249.
22. Cheng, S., Yang, J., Rifas, L., Zhang S. & Avioli, L. 1994. Differentiation of human bone-marrow osteogenic stromal cells in vitro - induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*. 134:277–286.
23. Chiellini, E., Corti, A., D'Antone, S. and Solaro, R. 2003. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials, *Prog. Polym. Sci.* 28: 963–1014
24. Chitteti, B.R., Cheng, Y.H., Streicher, D.A., Rodriguez-Rodriguez, S., Carlesso, N., Srour, E.F., Kacena, M.A. 2010. Osteoblast lineage cells expressing high levels of Runx2 enhance hematopoietic progenitor cell proliferation and function. *J Cell Biochem*. 111(2):284-94.
25. Cho, S.H. Oh, S.H. and Lee, J.H. 2005. Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 16 (8): 933–947
26. Chul, C., Ko, C. & Douglas, H. 2003. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials*. 24:2853–2862
27. Cliché, S., Amiot, J., Avezard, C. and Gariepy, C. 2003. Extraction and Characterization of Collagen with or Without Telopeptides from Chicken Skin. *Poultry Science*. 82:503–509
28. Constantz, R. 1999. Paste composition capable of setting into carbonate apatite. United States Patent Number 5952010.
29. Constantz, B.R., Fulmer, M., and Ison, I. 2002. Paste compositions capable of setting into carbonated apatite. United States Patent Number 6334891.
30. Currey, D. 1984. The mechanical adaptations of bones. Princeton University Press, Princeton. New Jersey.
31. D'ippolito, G., Schiller, C., Perez-Stable, C., Balkan, W., Roos, B., Howard G. 2002. Cooperative actions of hepatocyte growth factor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoblastic differentiation of human vertebral bone marrow stromal cells. *Bone* 3:269-275.

32. Dadsetan, M., Hefferan, T., Szatkowski, J., Mishra, P., Macura, S., Lu, L., Yaszemski, M. 2008. Effect of hydrogel porosity on marrow stromal cell phenotypic expression. *Biomaterials* 29: 2193–2202.
33. Dalby, M., Silveira, L., Harper, J., Bonfield W. 2002. Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response. *Biomaterials* 23: 569–576.
34. Degirmenbasi, N., Kalyon, M. and Birinci, E. 2006. Biocomposites of nanohydroxyapatite with collagen and poly(vinyl alcohol). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 48 :42–49.
35. Díaz, L., Villamil, M., Bernal, C., Torres, M., Thevi, J., Zakaria, F., Mikán, J. 2007. Cultivo de células de linaje osteogénico de periostio de porcino para la evaluación de un biomaterial. *Revista Med* 15: 192-206.
36. Diaz, L.M. 2006. Cultivo *in vitro* de células de linaje osteogénico provenientes de periostio de porcino. Tesis de Grado. Bogotá. Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias, Facultad de Medicina.
37. DiGirolamo, C., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D., Class, R., Prockop, D. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony- forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology* 107:275-281.
38. Doi, Y., Iwanaga, H., Shibutani, T., Moriwaki, Y., Iwayama, Y. 1999. Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. *Journal of Biomedical Materials Research* 47: 424-433.
39. Ducheyne, P. & Qiu, Q. 1999. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20: 2287-2303.
40. Ducky P., Schinke T., Karsenty G. 2000. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science*. 289 (5484): 1501-1504.
41. Duvall, C., Taylor, W., Weiss, D., Wojtowicz A. and Guldberg. R. 2007. Impaired angiogenesis, early callus formation and late stage remodelling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. *J. Bone Miner Res*. 22: 286-297.
42. Echeverri, C., Vallejo, C., Londoño, M. 2009. Síntesis y caracterización de hidrogeles de alcohol polivinílico por la técnica de congelamiento/descongelamiento para aplicaciones médicas. *Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia* 12: 59-66.
43. Eglin, D., Maalheem, S., Livage, J., Coradin, T. 2006. In vitro apatite forming ability of type I collagen Hydrogels containing bioactive glass and silica sol-gel particles. *Journal of materials science: materials in medicine* 17:161-167.
44. Encina N. R., Brillotte W. G., Hofmann M. C. 1999. Immunomagnetic Isolation of Osteoprogenitors from Human Bone Marrow Stroma. *Laboratory Investigation*. 79 (4): 449-464.
45. Estrada C., Paz C., López L. 2006. Ingeniería de Tejido Óseo: Consideraciones Básicas. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia). *Revista EIA*. 1794-1237 (5): 93-100.
46. Faghihi, F. and Eslaminejad, M. B. 2013. The effect of nano-scale topography on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*. 157: 1-12.
47. Fittkau, H., Zilla, P., Bezuidenhout, D. 2005. The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides. *Biomaterials* 26: 167-74.

48. Ford, C., Bertram, P., Hynes, S., Michaud, M., Li, Q., Young, M., *et al.* 2006. A macroporous hydrogel for the coculture of neural progenitor and endothelial cells to form functional vascular networks in vivo. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 103:2512-2517.
49. Fratzl P. and Weinkamer, R. 2007. Hierarchical Structure and Repair of Bone: Deformation, Remodelling, Healing, S. van der Zwaag (ed.), *Self Healing Materials. An Alternative Approach to 20 Centuries of Materials Science*, Springer: 323–335
50. Gensueta, R., Gardella, J. and Juppner, H. 2005. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 328: 666–678.
51. Gilbert S. 1997. *Developmental Biology*. Fifth edition. Chapter 9. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. USA. p. 351-356.
52. Gleeson, J.P., Plunkett, N.A., O'Brien F.J. 2010. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *European Cells and Materials* 20: 218-230.
53. Gordon, A., Tye, E., Sampaio, V., Underhill, T., Hunter, K. & Goldberg, A. 2007. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*. doi: 10.1016/j.bone.2007.04.191
54. Gronthos, S., Simmons, J., Graves, E. & Robey, G. 2001. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28:174-181.
55. Gross, J., Highberger, J.H., Schmit, F.O. 1955. Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS* 41: 1-7.
56. Gutierrez, S., Liu, J., Javed, A., Montecino, M., Stein, S., Lian, B. & Stein, L. 2004. The vitamin D response element in the distal osteocalcin promoter contributes to chromatin organization of the proximal regulatory domain. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 43581-43588.
57. Habibovic, P., De Groot, K. 2007. Osteoinductive biomaterials: Properties and relevance in bone repair. *Journal of tissue Engineering and Regenerative Medicine* 1: 25-32.
58. Hallam. 2002. Interaction of biomaterials with cells, protein and blood. www.fractures.com/institute/teaching/talks/Biomathcells.htm
59. Harada, S. & Rodan, G. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423:349-355.
60. (1) Hassan, C., Stewart, J. & Peppas, N. 2000. Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogels: Applications to protein controlled release from multilaminate devices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49 :161-165.
61. (2) Hassan, C. & Peppas, A. 2000. Structure and applications of Poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Advances in Polymer Science* 153: 38-61.
62. Hayami, T., Matsumura, K., Kusunoki, M., Nishikawa, H., Hontsu, S. 2006. Imparting cell adhesion to Poly(vinyl alcohol) hydrogel by coating with hydroxyapatite thin film. *Materials Letters* 61: 2367-237.

63. Hirai, F., Nakayamada, Sh., Okada, Y., Saito, K., Kurose, H., Mogami, A., Tanaka, Y. 2007. Small GTPase Rho signaling is involved in α_1 integrin-mediated up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor κ B ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356: 279-285.
64. Houston, B., Stewart, J. and Farquharson, C. 2004. PHOSPHO1 - A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage. *Bone*. 34:629– 637.
65. Hye-Sun, Y., Jong-Eun, W., Guang-Zhen, J. and Hae-Won, K. 2012. Construction of Mesenchymal Stem Cell-Containing Collagen Gel with a Macrochanneled Polycaprolactone Scaffold and the Flow Perfusion Culturing for Bone Tissue Engineering. *BioResearch Open Access*. 1 (3): 124-136.
66. Ikada, Y. 2006. Challenges in tissue engineering. *J. R. Soc. Interface* 3: 589–601
67. Jaiswal, N., Haynesworth, E., Caplan, I. & Bruder, P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cell Biochemistry* 64: 295-312.
68. Jaquíery C., Schaeren S., Farhadi J., Mainil-Varlet P., Kunz C., Zeilhofer H., Heberer M., Martin I. 2005. In Vitro Osteogenic Differentiation and In Vivo Bone-Forming Capacity of Human Isogenic Jaw Periosteal Cells and Bone Marrow Stromal Cells. *Annals of Surgery*. 242 (6): 859-868.
69. James, K., Levene, H., Parsons, J.R., Kohn, J. 1999. Small changes in polymer chemistry have a large effect on the bone-implant interface: evaluation of a series of degradable tyrosine-derived polycarbonates in bone defects. *Biomaterials* 20: 2203- 2212.
70. Jamuna-Thevi, K., Zakaria, F.A., Othman R., and Muhamad, S. 2009. Development of macroporous calcium phosphate scaffold via microwave rapid drying. *Materials Science and Engineering C*. 29: 1732 – 1740
71. Javed, A., Gutierrez, S., Montecino, M., Van Wijnen, J., Stein, L., Stein, S. & Lian, B. 1999. Multiple Cbfa/AML sites in the rat osteocalcin promoter are required for basal and vitamin D-responsive transcription and contribute to chromatin organization. *Molecular and Cellular Biology* 19:7491-7500.
72. Khanarian, N.T., Jiang, J., Wan, L.Q., Mow, V.C. and Lu H.H. 2012. A Hydrogel-Mineral Composite Scaffold for Osteochondral Interface Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. 18 (5- 6): 533-545
73. Kher, V.K., Bhongade, M.L., Shori, T.D., Kolte, A.P., Dharamthok, S.B. and Shrirao TS. 2013. A comparative evaluation of the effectiveness of guided tissue regeneration by using a collagen membrane with or without decalcified freeze-dried bone allograft in the treatment of infrabony defects: A clinical and radiographic study. *J Indian Soc Periodontol*. 17(4): 484-9.
74. Kim, Y.H., Cho, C.S., Kang, I.K., Kim S.Y. and Kwon, O.H. 2007. Investigation of Pore Size Effect on Cell Compatibility Using Pore Size Gradient Chitosan Scaffold. *Key Engineering Materials*. 342-343: 285-288
75. Kobayashi T., Kronenberg H. 2005. Minireview: Transcriptional Regulation in Development of Bone. *Endocrinology* 146 (3): 1012-1017.
76. Kofron M.D., Laurencin C.T. 2006. Bone Tissue Engineering by Gene Delivery. *Gene Delivery for Tissue Engineering. Advanced Drug Delivery Reviews*. 58 (4): 555-576.
77. Langstaff, S., Sayer, M., Smith, T.J., Pugh, S.M. 2001. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response. *Biomaterials* 22: 135-150.

78. Lee, K-S., Kim, H-J., Li, Q-L., Chi, X-Z., Ueta, C., Komori, T., *et al.* 2000. Runx2 Is a common target of transforming growth factor Beta1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Molecular and Cellular Biology* 20: 8783-8792.
79. Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y. 2001. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* 221: 1–22.
80. Lee, M., Kim, Y., Kim, H., Park, H., Kang, A., Kyung, H., *et al.* 2003. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 34387-34394.
81. Lee, S. J. and Atala, A. 2013. Editorial Scaffold technologies for controlling cell behavior in tissue engineering. *Biomed. Mater.* 8: 1-3
82. Leeuwenburgh, S.C.G., Ana, I.D., Jansen, J.A. 2010. Sodium citrate as an effective dispersant for the synthesis of inorganic–organic composites with a nanodispersed mineral phase. *Acta Biomaterialia*. 6 (3): 836-844
83. Levitt, R., Crayton, H., Monroe, A. & Condrate, A. 1969. Forming method for apatite prosthesis. *Journal Biomedical Material Research* 3: 683
84. Li, X., Liu, P., Liu, W., Maye, P., Zhang, J., Zhang, Y., *et al.* 2005. Ddk2 has a role in terminal OB differentiation and mineralized matrix formation. *Nature Genetics* 37: 945-952.
85. Lian, J. 2006. Biology of the mineralization. *Current Opinión in Endocrinology & Diabetes* 13: 1-9.
86. Lutolf, M.P., Lauer-Fields, J.L., Schmoekel, H.G., Metters, A.T., Weber, F.E., Fields, G.B., J. A. Hubbell. 2003. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 5413-8.
87. Machado, B., Ventura, G., Lemos, F., Ferreira, F., Leite, F. & Goes, M. 2007. 3D Chitosan-gelatin-chondroitin porous scaffold improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomedicine Material* 2: 124-131.
88. Manduca, P., Castagnino, A., Lombardini, D., Marchisio, S., Soldano, S., Ulivi, V. 2009. Role of MT1-MMP in the osteogenic differentiation. *Bone* 44: 251–265.
89. Manuey, J.R., Kaplan, D.L., Volloch, V. 2004. Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potencial by human adult bone marrow stromal cells during *ex vivo* expansion. *Biomaterials* 25: 3233-3243.
90. Mao, C., Kisaalita, W.S. 2004. Characterization of 3-D collagen hydrogels for functional cell-based biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 1075–1088.
91. Marcos-Campos, I., Marolt, D., Petridis, P., Bhumiratana, S., Schmidt, D. and Vunjak-Novakovic G. 2012. Bone scaffold architecture modulates the development of mineralized bone matrix by human embryonic stem cells. *Biomaterials*. 33(33): 8329-42.
92. Marcus, R. 1987. Normal and abnormal bone remodeling in man. *Annual Review of Medicine*. 38:129-141.
93. Merli, A., Canessa, A., and Terragna, A. 1987. Quantification of *Toxoplasma*-induced cytopathic effect (CPE) in vitro by the assessment of cell number via the endogenous enzyme, hesosaminidase. *Journal of Microbiological Methods*. 6:327-332.

94. Mikán, J., Villamil, M., Montes, T., Carretero, C., Bernal, C., Torres, M.L., Zakaria, F.A. 2009. A porcine model for a hybrid material of carbonated apatite and osteoprogenitor cells. *Materials Research Innovations* 13: 323-326.
95. Mikic, B. 1996. Epigenetic influences on long bone growth development and evolution. Tesis de grado PhD . Universidad de Standford.
96. Minhas, M.U., Ahmad, M., Ali, L. and Sohail, M. 2013. Synthesis of chemically cross-linked polyvinyl alcohol-co-poly (methacrylic acid) hydrogels by copolymerization; a potential graft-polymeric carrier for oral delivery of 5-fluorouracil. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 21(1):44-52.
97. Miyazaki, T., Ishikawa, K., Shirosaki, Y., Ohtsuki, C. 2013. Organic-inorganic composites designed for biomedical applications. *Biol Pharm Bull*. 36(11):1670-5.
98. Morinobu, M., Ishijima, M., Rittling, S., Tsuji, K., Yamamoto, H., Nifuji, A., Denhardt D. and Noda. M. 2003. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in calvarial suture in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18: 1706-1715.
99. Murphy, C.M., Haugh, M.G. and O'Brien F.J. 2010. Investigating the effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 31(3): 461-466
100. Neel, M. 2003. The use of periosteal replacement membrane for bone graft containment at allograft-host junctions after tumor resection and reconstruction with bulk allograft. *Orthopedics*. May Supplement 26. En: <http://www.orthobluejournal.com/supp/0503/neel.asp>.
101. Nguyen, H., Qian, J., Bhatnagar, S. & Li, S. 2003. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311: 179-186.
102. Novaes Jr., A. B., Souza, S., Barros, R., Pereira, K., Iezzi, G., Piattelli, A. 2010. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian Dental Journal* 21: 471-481.
103. Nuttelman, R., Mortisen, J., Henry, M., Anseth, S. 2001. Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promote NIH3T3 cell adhesion proliferation and migration. *Journal of Biomedical Material Research*. 57: 217-23.
104. Nuttelman, R., Benoit, W., Tripodia, C., Anseth, S. 2006. The effect of ethylene glycol methacrylate phosphate in PEG hydrogels on mineralization and viability of encapsulated hMSCs. *Biomaterials* 27: 1377-1386.
105. O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V. and Gibson, L.J. 2005. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 26: 433-441
106. Paradossi, G., Cavalieri, F., Chiessi, E., 2003. Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14: 687 – 691.
107. Peng J.J. and Wang C.H. 2010. An Investigation on the Influence of Pore Size and Porosity of Sponge on Maximum Cell Concentration. *Proceeding of National Undergraduate Research Opportunities Programme Congress 2010 (15th NUROP)*. National University of Singapore, Singapore.
108. Pilia, M., Guda, T., Shiels, S.M., Appleford, M.R. 2013. Influence of substrate curvature on osteoblast orientation and extracellular matrix deposition. *J Biol Eng*. 7(1): 23.

109. Raeber, P., Lutolf, P. & Hubbell, A. 2005. Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically-mediated cell migration. *Biophysical Journal* 89: 1374-88.
110. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. 2004. *Biomaterials Science, Second Edition: An introduction to materials in medicine*. Academic Press. New York, USA.
111. Reichert, J.C., Heymer, A., Berner, A., Eulert, J., Nöth, U. 2009. Fabrication of polycaprolactone collagen hydrogel constructs seeded with mesenchymal stem cells for bone regeneration. *Biomedical Materials* 4: 1-11.
112. Ringe, J., Kaps, C., Schmitt, B., Büscher, K., Bartel, J., Smolian, H., *et al.* 2002. Porcine mesenchymal stem cells induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell and Tissue Research* 307: 321-327.
113. Rosengren, A. 2004. Cell -protein material interaction on bioceramics and model surfaces. *Acta Universitatis Upsaliensis*. Uppsala. Pag: 15.
114. Rosiak, J. & Yoshii, F. 1999. Hydrogels and their medical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 151:56-64.
115. Ru-yin, M., Dang-sheng, X. 2008. Synthesis and properties of physically crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels. *Journal of China University of Mining and Technology* 18: 0271–0274.
116. Sakai, A., Valanezhad, A., Ozaki, M., Ishikawa, K. and Matsuya, S. 2012. Preparation of Sr-containing carbonate apatite as a bone substitute and its properties. *Dent Mater J.* 31(2):197-205.
117. Salaszyk, R.M., Klees, R.F., Hughlock, M.K., Plopper, G.E. 2004. ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Adhesion & Communication*. 11: 137-53.
118. Saltzman, W.M., Kyriakides, T.R. 2007. *Principles of tissue engineering*. Chapter Twenty: Cell interactions with polymers. 3rd Edition. Elsevier, Inc.
119. Scotchford, C., Cascone, M., Downes, S. & Giusti, P. 1998. Osteoblast responses to collagen-PVA bioartificial polymers in vitro: the effect of cross-linking method and collagen content. *Biomaterials*. 19: 1-11.
120. Schaefer D.J., Klemm C., Zhang XH., Stark GB. 2000. Tissue Engineering with Mesenchymal Stem Cells for Cartilage and Bone Regeneration. *Chirurg*. 71: 1001-1008.
121. Schilling, F., Linhart, W., Filke, S., Gebauer, M., Schinke, T., Rueger, M. and Amling, M. 2004. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 25: 3963–3972.
122. Schmid R. 2002. Stem Cells: A Dramatic New Therapeutic Tool. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17: 636-642.
123. Schor, S. and Court, J. 1979. Different mechanisms in the attachment of cells to native and denaturated collagen. *Journal Cell Science*. 38:267-81.
124. Shekaran, A., García, A.J. 2011. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *J Biomed Mater Res*. 96(1):261-72.
125. Song, W., Markel, D.C., Jin, X., Shi, T., Ren, W. 2012. Poly(vinylalcohol)/ collagen/ hydroxyapatite hydrogel: Properties and in vitro cellular response. *J Biomed Mater Res Part A*. 100A: 3071–3079.

126. Soto, D., Oliva, H. 2012. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* 32 (2): 154-175
127. Stauffer, R. & Peppas, A. 1992. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. *Polymer*. 33: 3932-3936.
128. Stuart, J. & Smith, D. 1992. Use of the fluorochromes xylenol orange, Calcein Green, and Tetracycline to document bone deposition and remodeling in healing Fractures in chickens. *Avian Diseases* 36:447-449.
129. Sun, Z., Tee, B.C., Kennedy, K.S., Kennedy, P.M., Kim, D.G., Mallery, S.R. and Fields, H.W. 2013. Scaffold-based delivery of autologous mesenchymal stem cells for mandibular distraction osteogenesis: preliminary studies in a porcine model. *PLoS One*. 8(9): 1-14
130. Tai, H.Y. Mather, M.L. Howard, D. Wang, W.X. White, L.J. Crowe, J.A. Morgan, S.P. Chandra, A. Williams, D.J. Howdle, S.M. and Shakesheff, K.M. 2007. Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing. *European Cells and Materials* 14: 64-77.
131. Thongphud, A. Paosawatyanong, B. Visal-athaphand, P. Supaphol, P. 2008. Improvement of Hydrophobic Properties of the Electrospun PVA Fabrics by SF₆ Plasma Treatment. *Advanced Materials Research* 55-57: 625-628
132. Tubbs, R.K. 1966. Sequence distribution of partially hydrolyzed poly(vinyl acetate). *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*. 4 (3): 623-629
133. Varshosaz, J. and Koopaie N., 2002. Cross-linked Poly (vinyl alcohol) Hydrogel: Study of Swelling and Drug Release Behaviour. *Iranian Polymer Journal*, 11 (2): 123-131
134. Villamil, M. 2009. Síntesis de una matriz de Polivinil alcohol, Colágeno y Apatita Carbonatada para el cultivo de células osteoprogenitoras de médula ósea de porcino. Tesis de Grado, Maestría. Bogotá. Facultad de Medicina. Universidad Militar Nueva Granada. Universidad Nacional de Colombia.
135. Wan, Y. Huang, W.Q. Wang Z. and Zhu, X.X. 2004. Preparation and characterization of high loading porous crosslinked poly (vinyl alcohol) resins. *Polymer* 45: 71-77
136. Weaver, M. & Petersen, W. 1997. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies. *Journal of Cell Biology* 137: 231-245.
137. Wejheden, C., Brunnberg, S., Hanberg, A. & Lind, M. 2006. Osteopontin: A rapid and sensitive response to dioxin exposure 3 in the osteoblastic cell line UMR-106. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341: 1400-1404.
138. Woodard, J.R., Hildore, A.J., Lan, S.K., Park, C.J., Morgan, A.W., Eurell, J.A., *et al.* 2007. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 28: 45-54.
139. Wu, L.B. and Ding, J.D. 2005. Effects of porosity and pore size on *in vitro* degradation of three-dimensional porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 75A: 767-777.
140. Xia, Y., Zhou, P., Cheng, X., Xie, Y., Liang, C., Li, C., Xu, S. 2013 Selective laser sintering fabrication of nano-hydroxyapatite/poly-ε-caprolactone scaffolds for bone tissue engineering applications. *Int J Nanomedicine*. 8: 4197-213.

141. Xiao, G., Wang, D., Benson, M., Karsenty, G., and Franceschi, T. 1998. Role of the $\alpha 2$ -Integrin in Osteoblast-specific Gene Expression and Activation of the Osf2 Transcription Factor. *The Journal Of Biological Chemistry* 273(49): 32988–32994
142. Yamate, T., Mocharla, H., Taguchi, Y., Igietseme, J., Monologas S. and Abe. E. 1997. Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow. *Endocrinology*. 138: 3047-3055.
143. Yamauch, N., Nishikawa, E., Kido, J., Ohishi, K., Nagata, T., Kataoka M. and Ishida. H. 1997. Relationship between the expression of parathyroid hormone receptors and hormonal effect during rat osteoprogenitor cell differentiation. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 15: 17-22.
144. Yang, F., Williams, G., Wang, A. 2005. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 26: 5991-8.
145. Yannas, V. and Tobolsky, A. 1967. Crosslinking of gelatine by dehydration. *Nature*. 215: 509-510.
146. Yeung, F., Law, K., Yeh, Ch., Westendorf, J., Zhang, Y., Wang, R., Kao, Ch. & Chung, K. 2002. Regulation of human osteocalcin promoter in hormone independent human prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 2468-2476.
147. Yunoki, S., Ikoma, T., Monkawa, A., Ohta, K., Kikuchi, M., Sotome, S., Shinomiya, K., Tanaka, J. 2006. Control of pore structure and mechanical property in hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth. *Materials Letters* 60: 999-1002.
148. Zajackowski, M.B., Cukierman, E., Galbraith, C.G., Yamada, K.M. 2003. Cell-matrix adhesions on poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Tissue Engineering* 9: 525-33.
149. Zakaria, F.A., Marsad, N.H., Abdul, A.Y., Villamil, M., Montes, T., Carretero, C. and Mikan, J. 2009. Characterisation of carbonated apatite for possible application in biomedical implants. *Materials Research Innovations* 13: 309- 312.
150. Zapanta, R. 2002. Properties of osteoconductive biomaterials calcium phosphates. *Clinical Orthopedics and Related Research* 395: 81-98.
151. Zarrinkalam, K., Kuliwaba, J., Martin, R., Wallwork, M. & Fazzalari, N. 2005. New insights into the propagation of fatigue damage in cortical bone using confocal microscopy and chelating fluorochromes. *European Journal of Morphology* 42: 81-90.
152. Zeltinger, J., Sherwood, J.K., Graham, D., Müller R. and Griffith. L.G. 2001. Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. *Tissue Engineering*. 7(5): 557-572
153. Zhao, X., Kim, J., Cezar, C.A., Huebsch, N., Lee, K., Bouhadir, K., Mooney, D.J. 2011. Active scaffolds for on-demand drug and cell delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108: 67–72.

ANEXOS

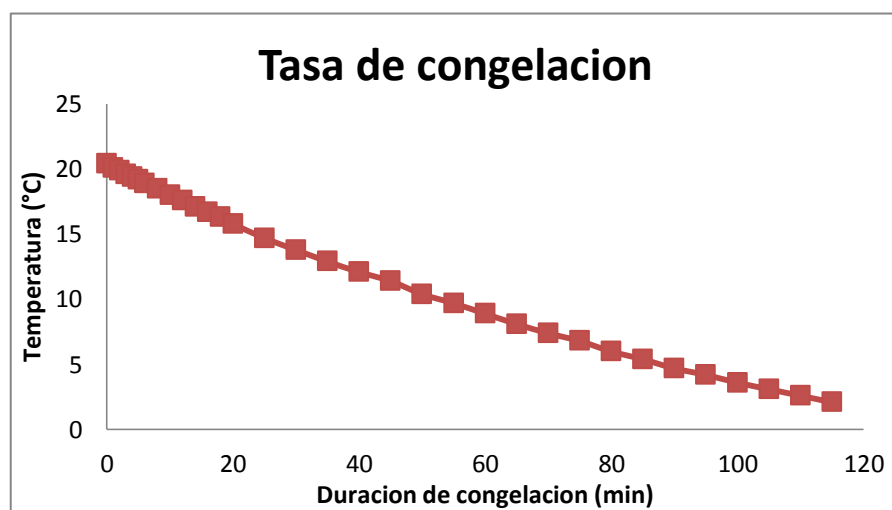
Anexo # 1

Monitoreo de congelación final en los hidrogeles de PVA

Para garantizar la mayor formación de cristales en los hidrogeles de PVA, terminados los ciclos de congelación y descongelación las muestras fueron dispuestas en una caja de icopor y cubiertas totalmente por pequeñas esferas de polietileno para aislarlas del frío directo y esperando que la temperatura decrezca de forma gradual dentro del sistema. Para comprobar esto dentro del dispositivo se instaló un termómetro digital y se tomó la temperatura inicial a la que el sistema fue cerrado, luego la temperatura se siguió tomando en intervalos de tiempo por dos horas. Se puede ver que la temperatura decrece de forma constante con el tiempo como se esperaba y que el aislamiento de los tratamientos tiene el efecto esperado.

Tiempo (minutos)	Temperatura °C	Tasa de congelación (°C/min)
0	20,4	
1	20,1	20,10
2	19,9	9,95
3	19,6	6,53
4	19,4	4,85
5	19,2	3,84
6	18,9	3,15
8	18,5	2,31
10	18	1,80
12	17,6	1,47
14	17,1	1,22
16	16,7	1,04
18	16,3	0,91
20	15,8	0,79
25	14,7	0,59
30	13,8	0,46
35	12,9	0,37
40	12,1	0,30
45	11,4	0,25
50	10,4	0,21
55	9,7	0,18
60	8,9	0,15

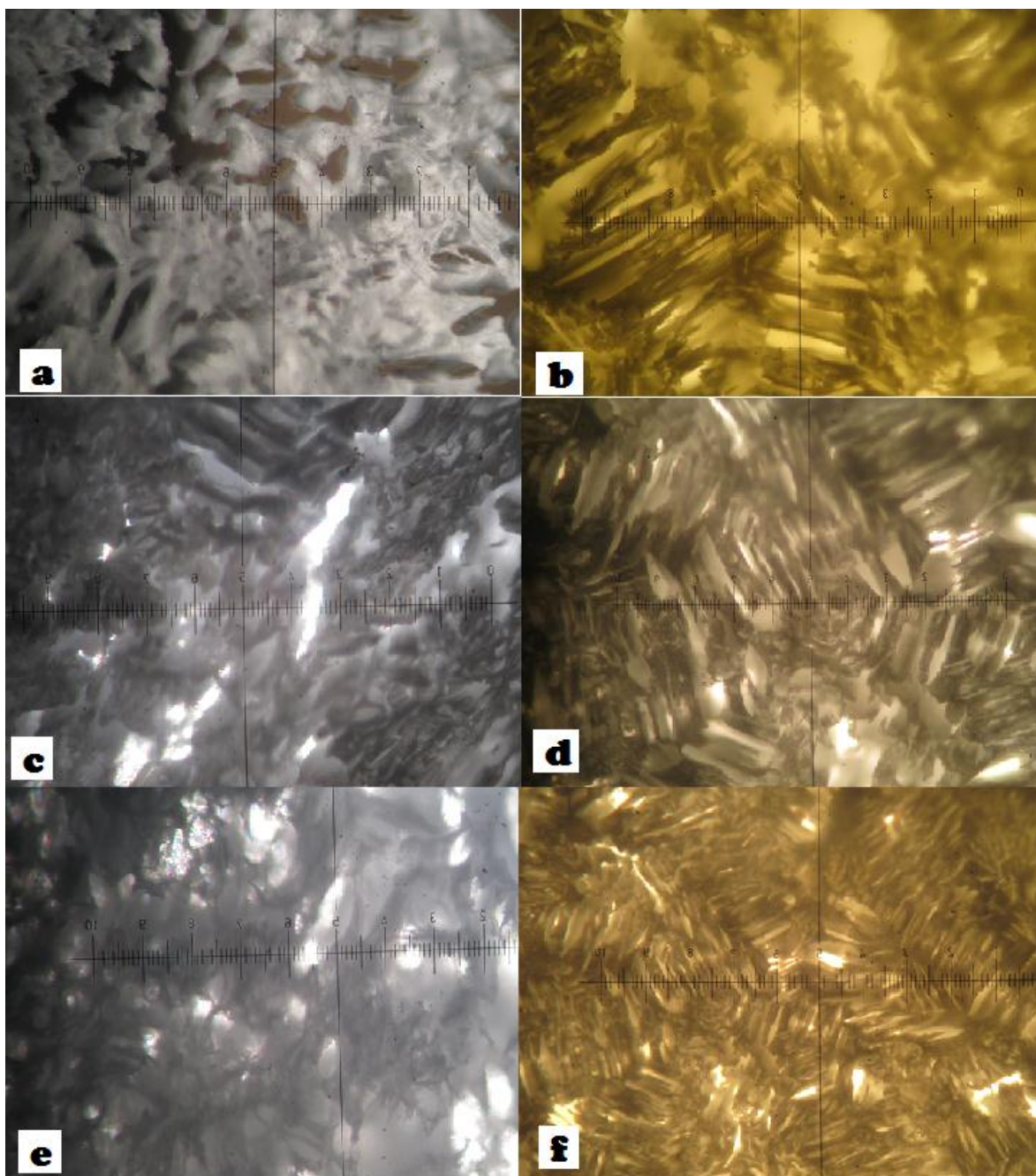
65	8,1	0,12
70	7,4	0,11
75	6,8	0,09
80	6	0,08
85	5,4	0,06
90	4,7	0,05
95	4,2	0,04
100	3,6	0,04
105	3,1	0,03
110	2,6	0,02
115	2,1	0,02
960	-7,6	0,01



Anexo # 2

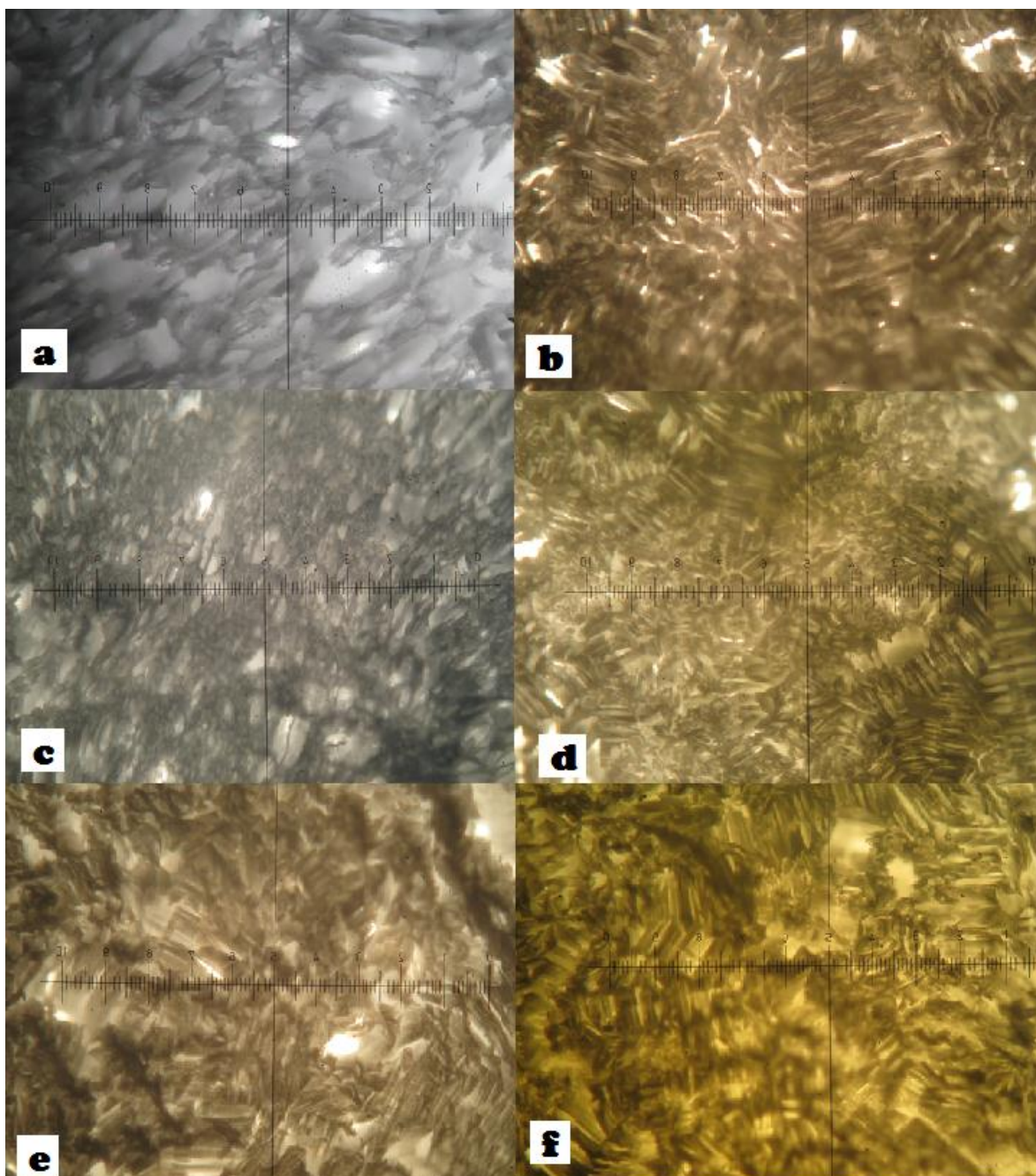
Tamaño y Morfología de los poros

Hidrogeles de PVA. Tratamiento 3:93



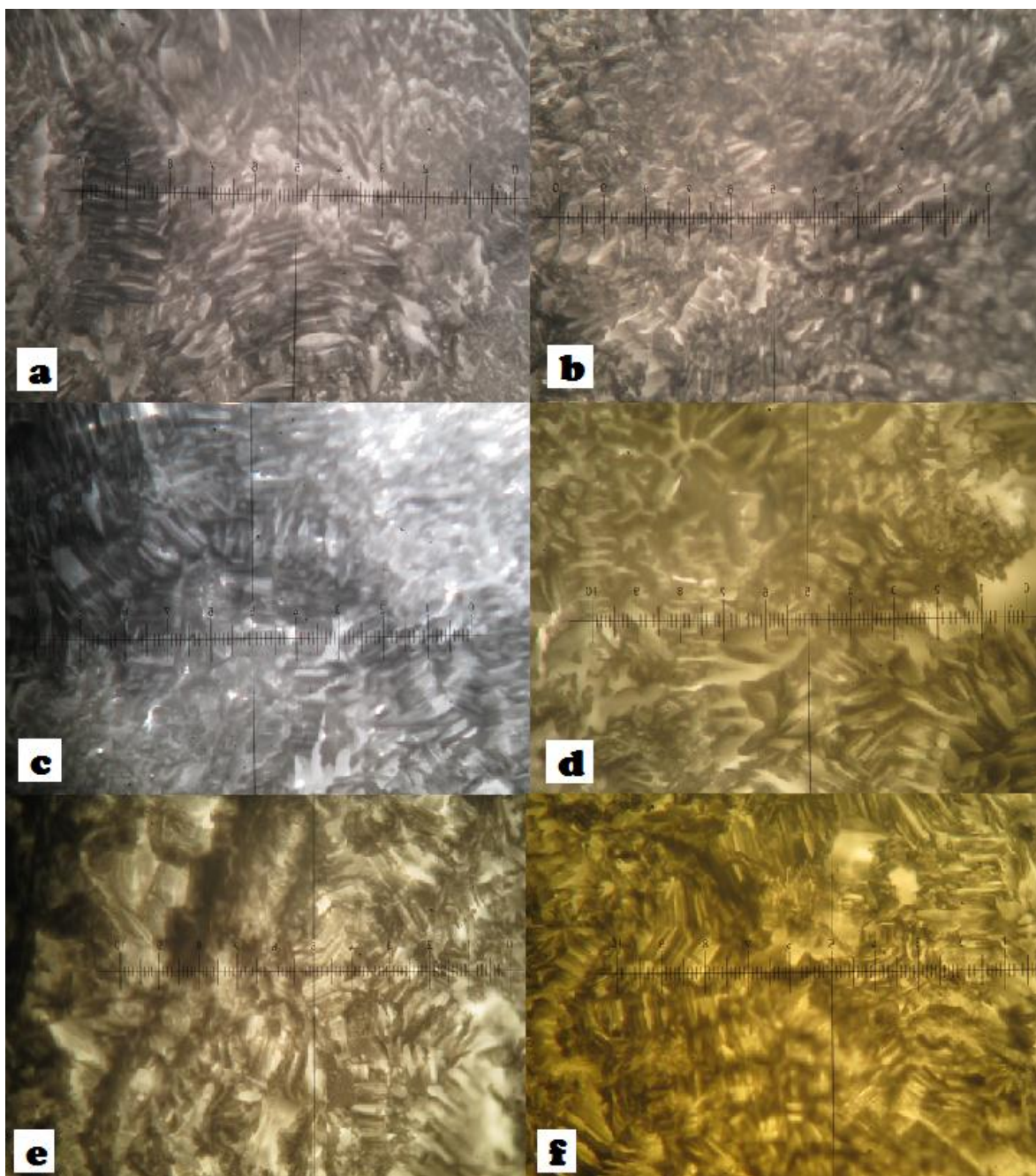
(a) 3 ciclos de congelación descongelación (C/DC) Sin tratamiento Dehidrotermal (DHT) (b) 3 ciclos de C/DC Con DHT (c) 5 ciclos de C/DC Sin DHT (d) 5 ciclos de C/DC Con DHT (e) 7 ciclos de C/DC Sin DHT (f) 7 ciclos de C/DC Con DHT. Las fotos fueron tomadas con un aumento 5x.

Hidrogeles de PVA. Tratamiento 5:95



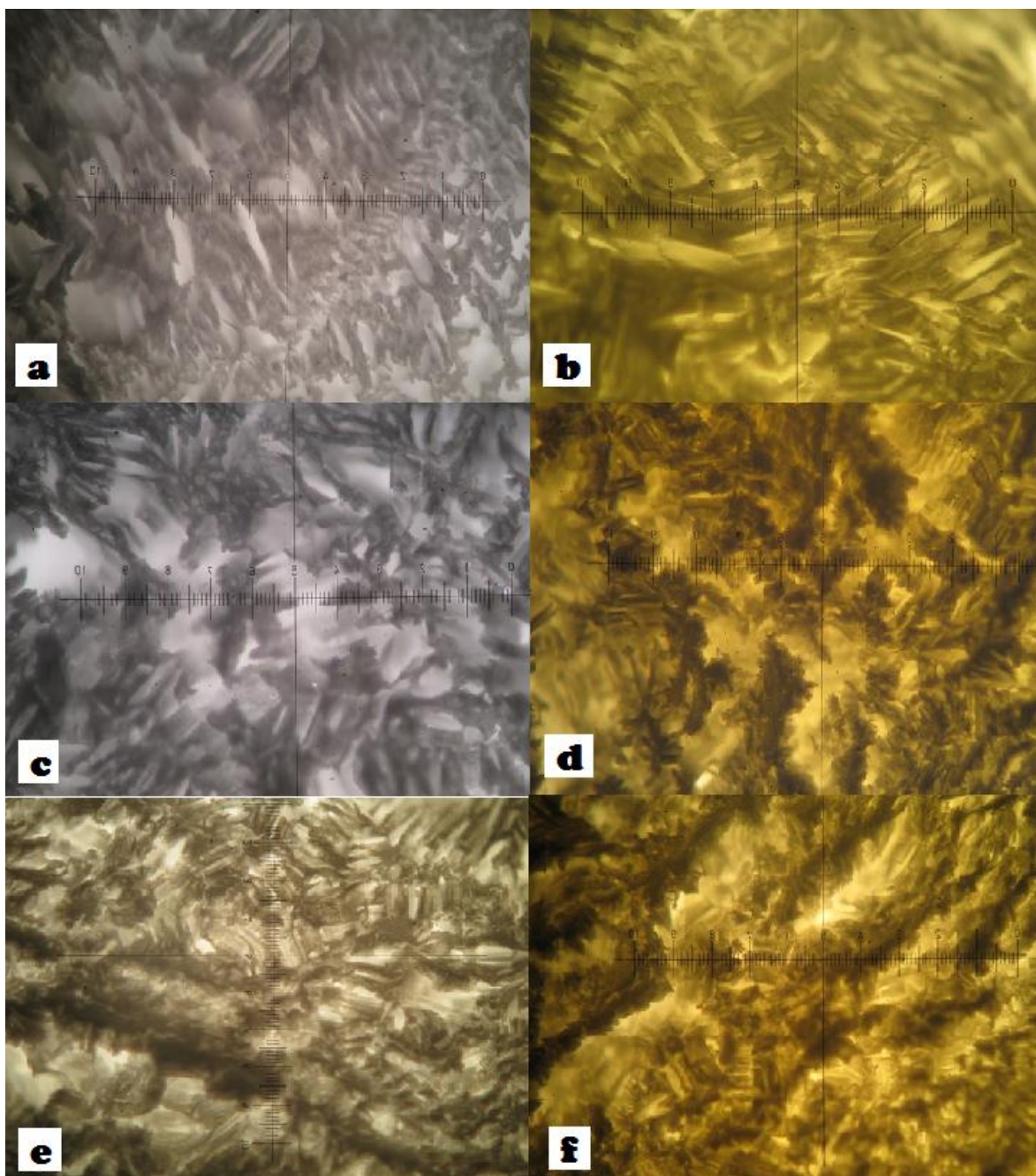
(a) 3 ciclos de congelación descongelación (C/DC) Sin tratamiento Dehidrotermal (DHT) (b) 3 ciclos de C/DC Con DHT (c) 5 ciclos de C/DC Sin DHT (d) 5 ciclos de C/DC Con DHT (e) 7 ciclos de C/DC Sin DHT (f) 7 ciclos de C/DC Con DHT. Las fotos fueron tomadas con un aumento 5x.

Hidrogeles de PVA. Tratamiento 8:92



(a) 3 ciclos de congelación descongelación (C/DC) Sin tratamiento Dehidrotermal (DHT) (b) 3 ciclos de C/DC Con DHT (c) 5 ciclos de C/DC Sin DHT (d) 5 ciclos de C/DC Con DHT (e) 7 ciclos de C/DC Sin DHT (f) 7 ciclos de C/DC Con DHT. Las fotos fueron tomadas con un aumento 5x.

Hidrogeles de PVA. Tratamiento 10:90

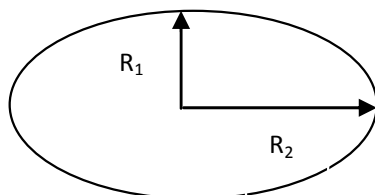


(a) 3 ciclos de congelación descongelación (C/DC) Sin tratamiento Dehidrotermal (DHT) (b) 3 ciclos de C/DC Con DHT (c) 5 ciclos de C/DC Sin DHT (d) 5 ciclos de C/DC Con DHT (e) 7 ciclos de C/DC Sin DHT (f) 7 ciclos de C/DC Con DHT. Las fotos fueron tomadas con un aumento 5x.

Anexo # 3

Evaluación del área de poros para cada tratamiento

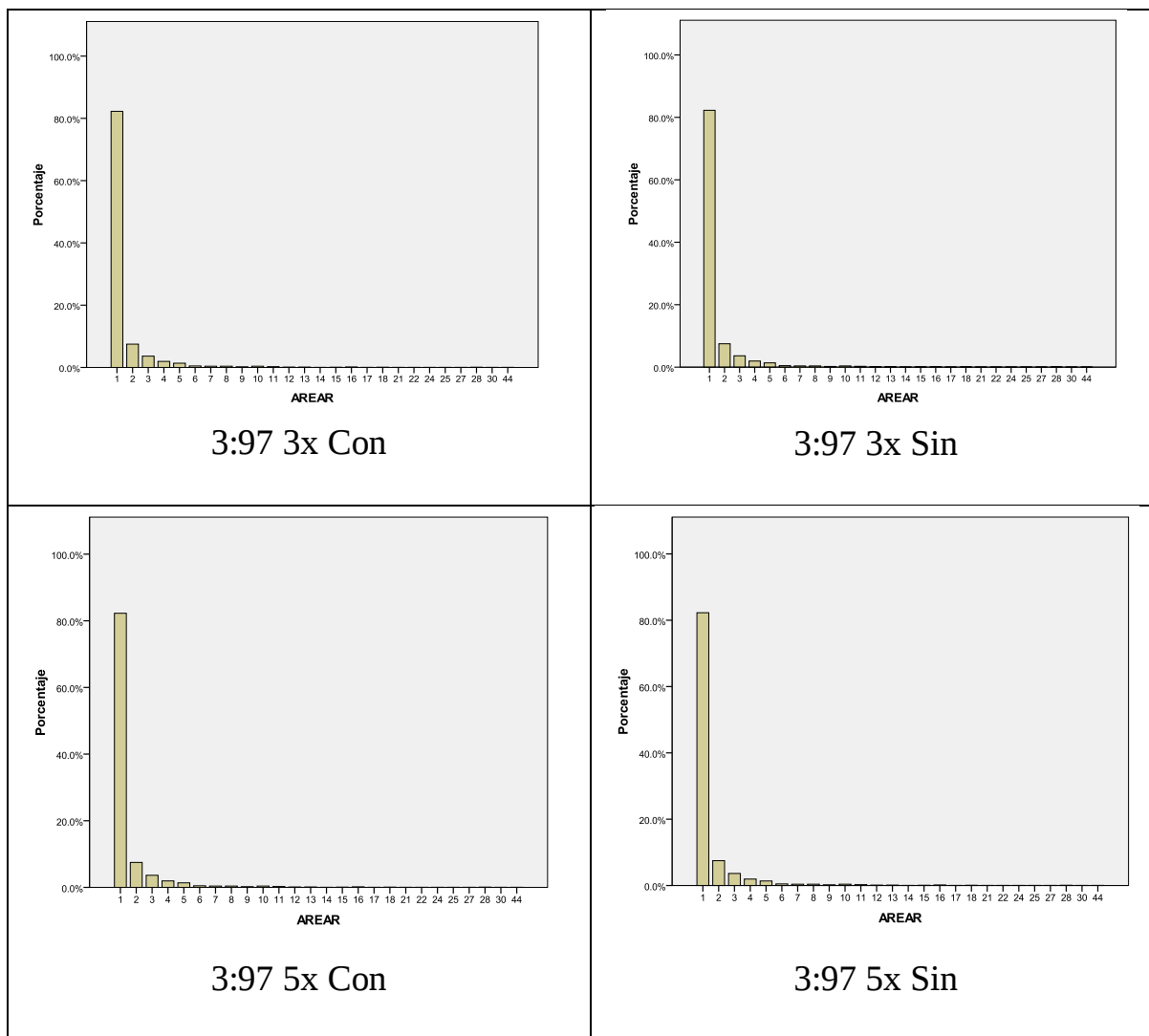
Se determinaron tres rangos de diametro de poro ($2R_2$): menor que 160 μm , de 161 a 425 μm y mayores de 426 μm . Se calculo R_2 a partir de la ecuacion $A = \pi R_1 R_2$ y reemplazando R_1 por la razon $R_1 = 2.9R_2$ estimada a partir de la medida realizada en microscopio a 80 poros aleatoriamente:

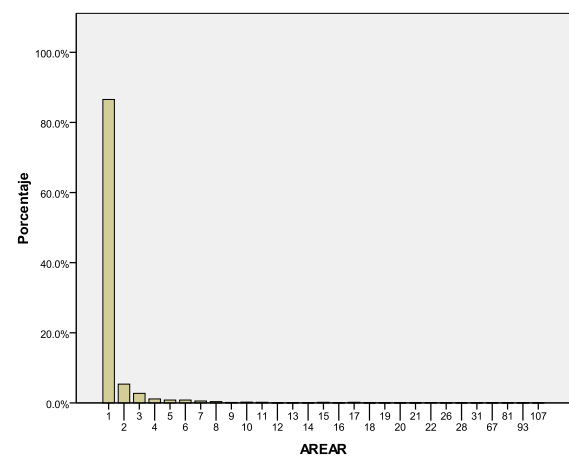
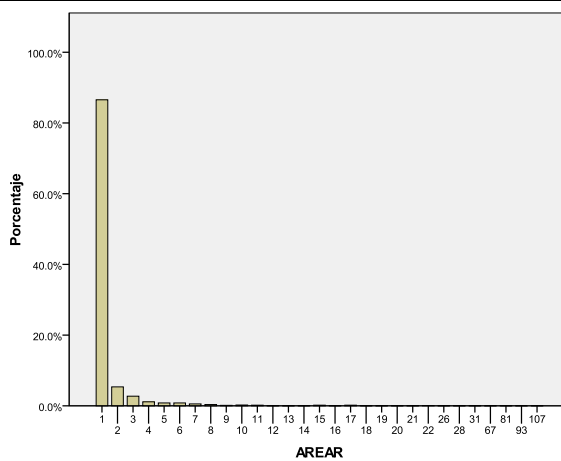
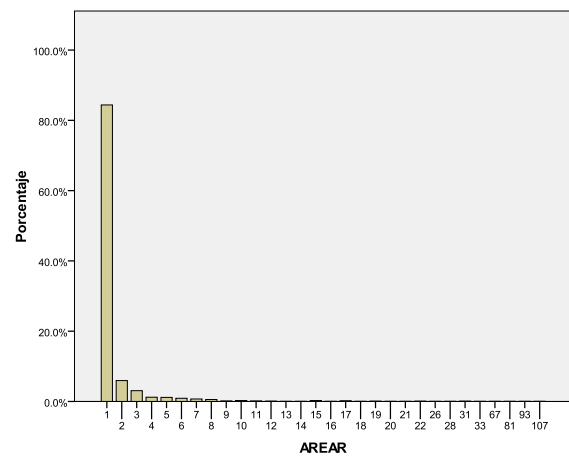
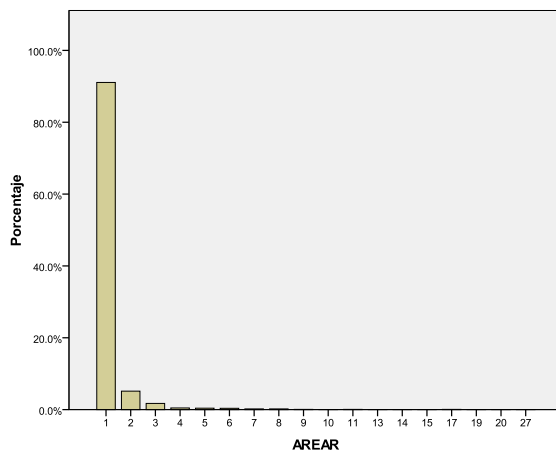
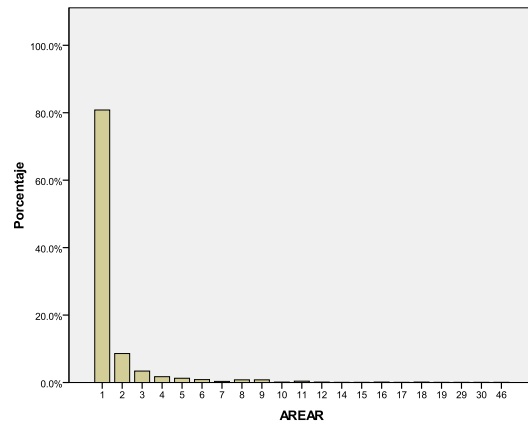
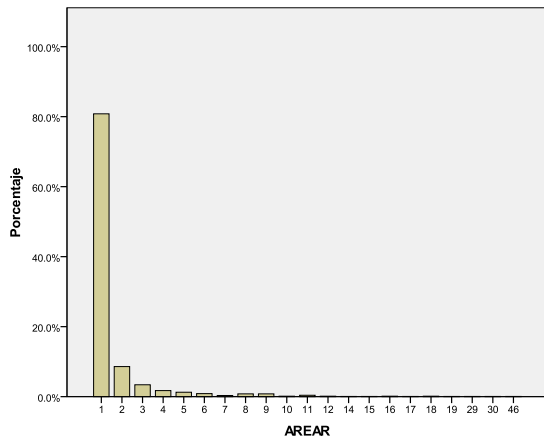


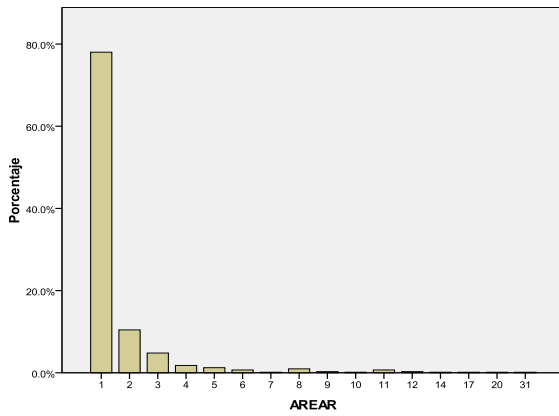
D2	R2	D1	R1	RAZON (R1/R2)
28.6	14.3	7.6	3.8	3.8
26.2	13.1	6.7	3.4	3.9
38.0	19.0	7.6	3.8	5.0
30.8	15.4	9.5	4.8	3.2
29.6	14.8	8.5	4.3	3.5
24.6	12.3	6.7	3.4	3.7
29.2	14.6	5.8	2.9	5.0
35.5	17.8	12.8	6.4	2.8
46.5	23.3	13.6	6.8	3.4
56.9	28.5	12.0	6.0	4.7
51.3	25.7	13.6	6.8	3.8
85.1	42.6	17.3	8.7	4.9
41.1	20.6	16.1	8.1	2.6
77.1	38.6	17.9	9.0	4.3
70.2	35.1	24.2	12.1	2.9
81.3	40.7	19.6	9.8	4.1
74.2	37.1	19.0	9.5	3.9
70.3	35.2	14.1	7.1	5.0
84.8	42.4	18.4	9.2	4.6
27.0	13.5	18.0	9.0	1.5
76.0	38.0	31.1	15.6	2.4
68.4	34.2	17.7	8.9	3.9
60.1	30.1	13.0	6.5	4.6
43.0	21.5	13.0	6.5	3.3
56.4	28.2	31.4	15.7	1.8
69.3	34.7	32.6	16.3	2.1
48.7	24.4	25.8	12.9	1.9
67.5	33.8	15.7	7.9	4.3
36.9	18.5	31.9	16.0	1.2
82.3	41.2	48.9	24.5	1.7
42.5	21.3	12.1	6.1	3.5
67.3	33.7	18.4	9.2	3.7

59.2	29.6	34.0	17.0	1.7
62.7	31.4	24.2	12.1	2.6
48.5	24.3	14.4	7.2	3.4
51.5	25.8	24.4	12.2	2.1
55.9	28.0	29.1	14.6	1.9
57.3	28.7	31.8	15.9	1.8
51.6	25.8	24.8	12.4	2.1
60.7	30.4	28.3	14.2	2.1
59.4	29.7	23.3	11.7	2.5
38.9	19.5	11.2	5.6	3.5
47.5	23.8	23.3	11.7	2.0
66.2	33.1	9.9	5.0	6.7
30.4	15.2	13.5	6.8	2.3
64.4	32.2	23.3	11.7	2.8
55.6	27.8	18.6	9.3	3.0
52.9	26.5	24.8	12.4	2.1
50.9	25.5	24.2	12.1	2.1
45.4	22.7	19.3	9.7	2.4
53.2	26.6	26.1	13.1	2.0
84.8	42.4	34.1	17.1	2.5
58.7	29.4	32.4	16.2	1.8
60.0	30.0	34.7	17.4	1.7
31.8	15.9	11.1	5.6	2.9
27.6	13.8	22.2	11.1	1.2
56.4	28.2	15.3	7.7	3.7
55.1	27.6	30.9	15.5	1.8
48.3	24.2	19.7	9.9	2.5
63.2	31.6	28.2	14.1	2.2
48.5	24.3	17.0	8.5	2.9
56.3	28.2	50.2	25.1	1.1
68.7	34.4	17.7	8.9	3.9
32.6	16.3	8.5	4.3	3.8
45.3	22.7	15.0	7.5	3.0
43.4	21.7	16.6	8.3	2.6
51.9	26.0	23.1	11.6	2.2
24.7	12.4	9.5	4.8	2.6
36.9	18.5	18.4	9.2	2.0
53.2	26.6	36.9	18.5	1.4
46.3	23.2	29.4	14.7	1.6
81.0	40.5	24.3	12.2	3.3
PROMEDIO DE LA RAZON (R1/R2)				2.9

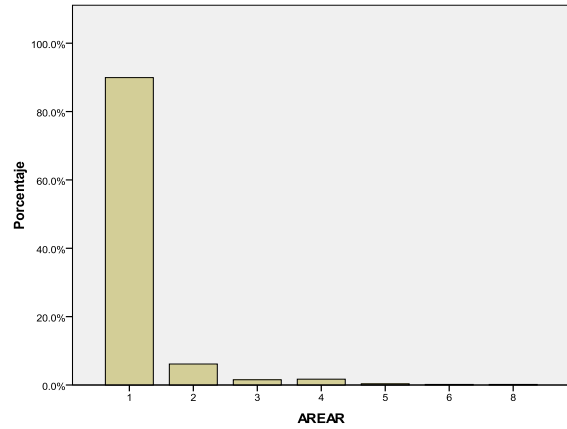
Calculo del area de los poros con Software Motic Image Plus y el programa estadístico SPSS. En cada grafico se ve el porcentaje de poros obtenido entren rango especifico de área de poro. Las graficas presentadas corresponden a cada uno de los tratamientos evaluados. Ejemplo: **3:97**, corresponde a la proporcion de PVA, **3x**, corresponde a la cantidad de ciclos de descongelacion y descongelacion, **Con**, corresponde a si la muestra fue tratada o no con dehidrotermal.



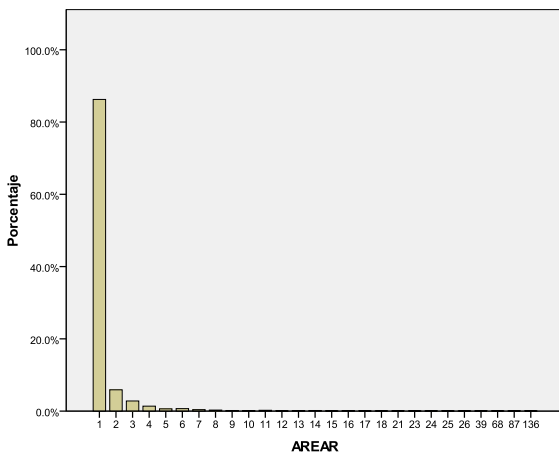




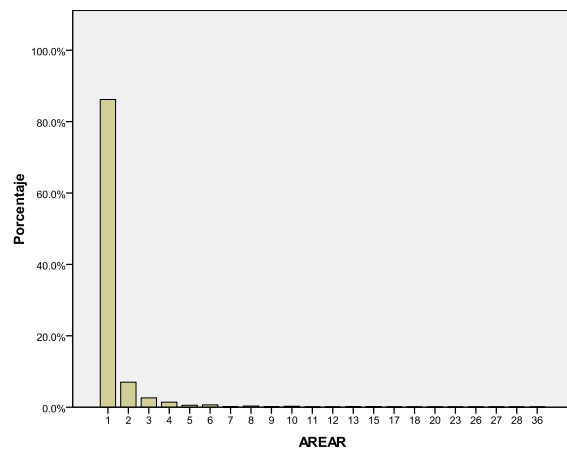
5:95 7x Con



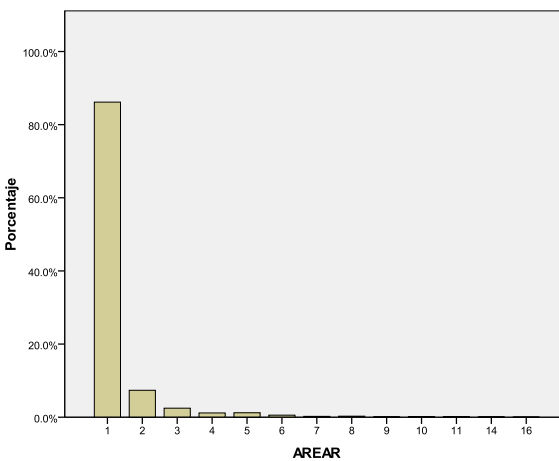
5:95 7x Sin



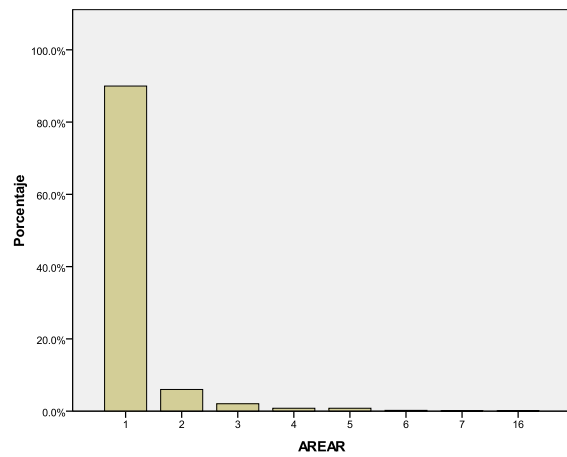
6:94 3x Con



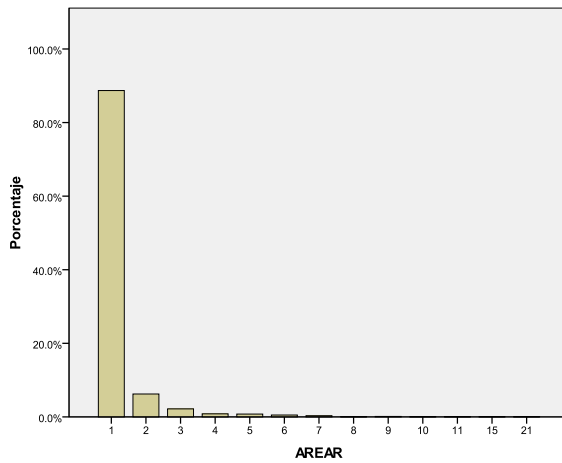
6:94 3x Sin



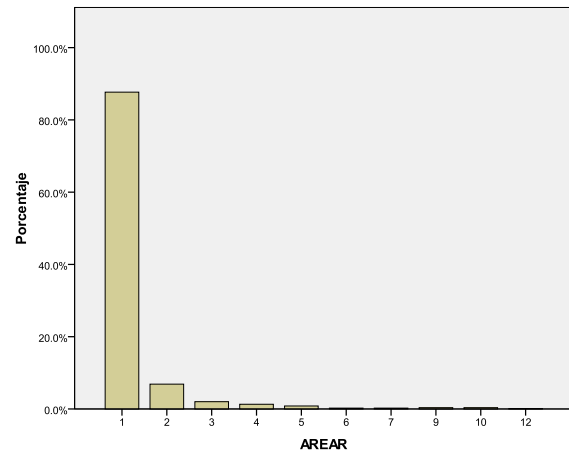
6:94 5x Con



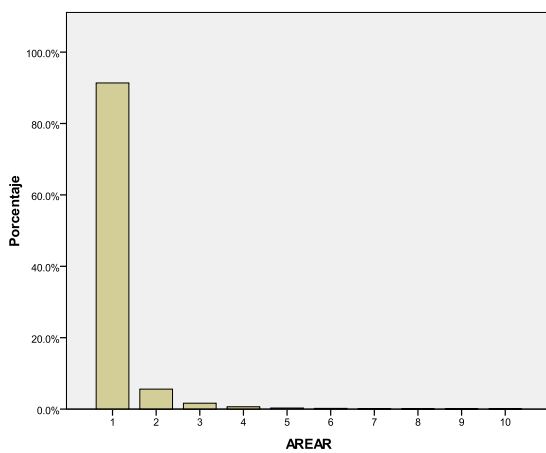
6:94 5x Sin



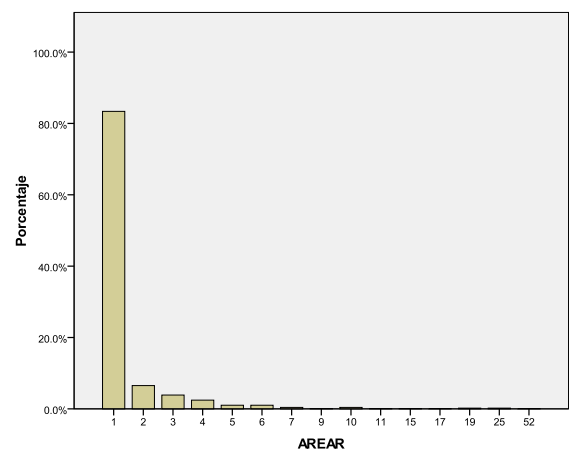
6:94 7x Con



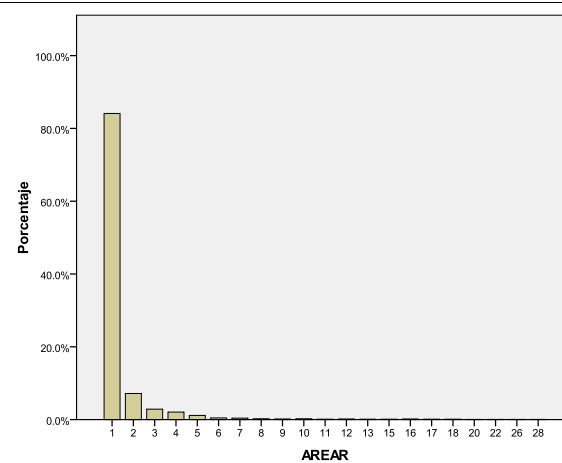
6:94 7x Sin



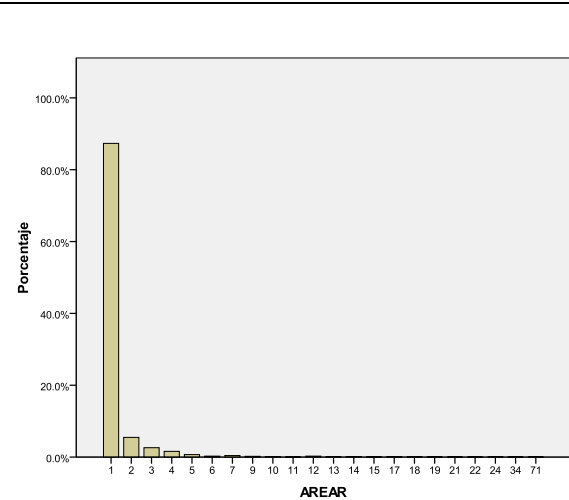
8:92 3x Con



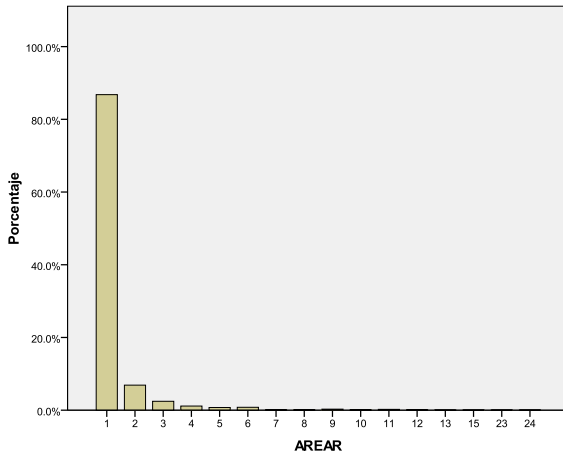
8:92 3x Sin



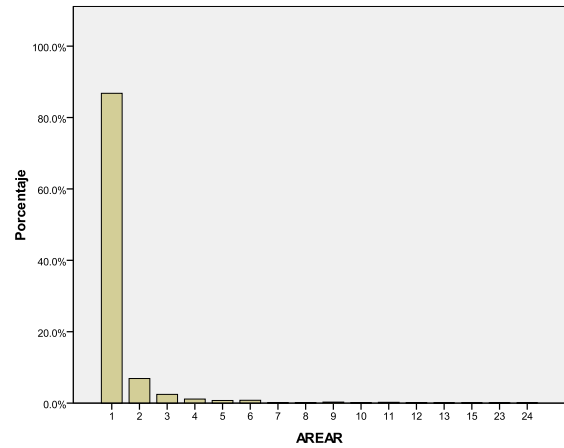
8:92 5x Con



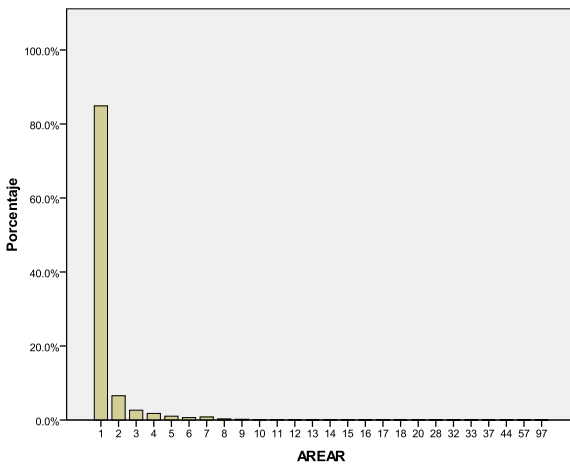
8:92 5x Sin



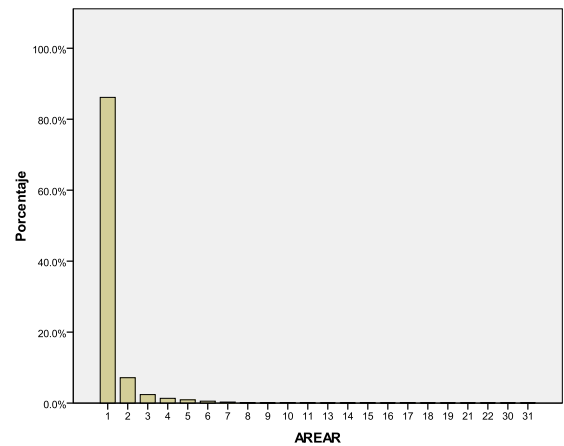
8:92 7x Con



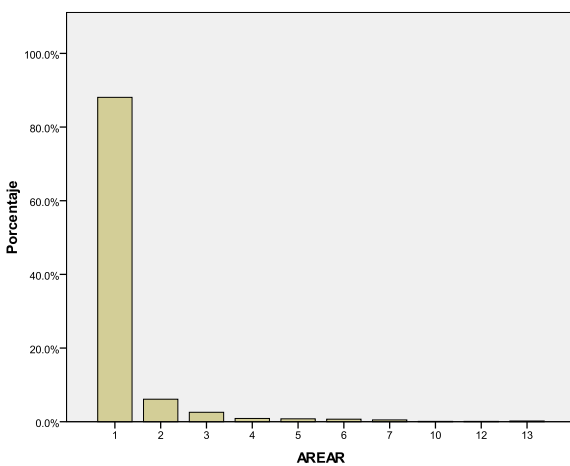
8:92 7x Sin



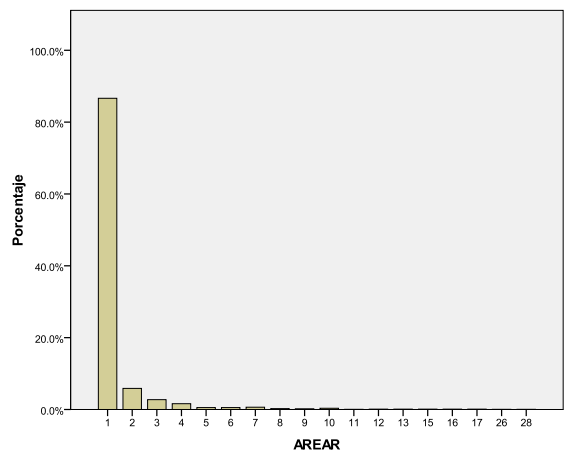
10:90 3x Con



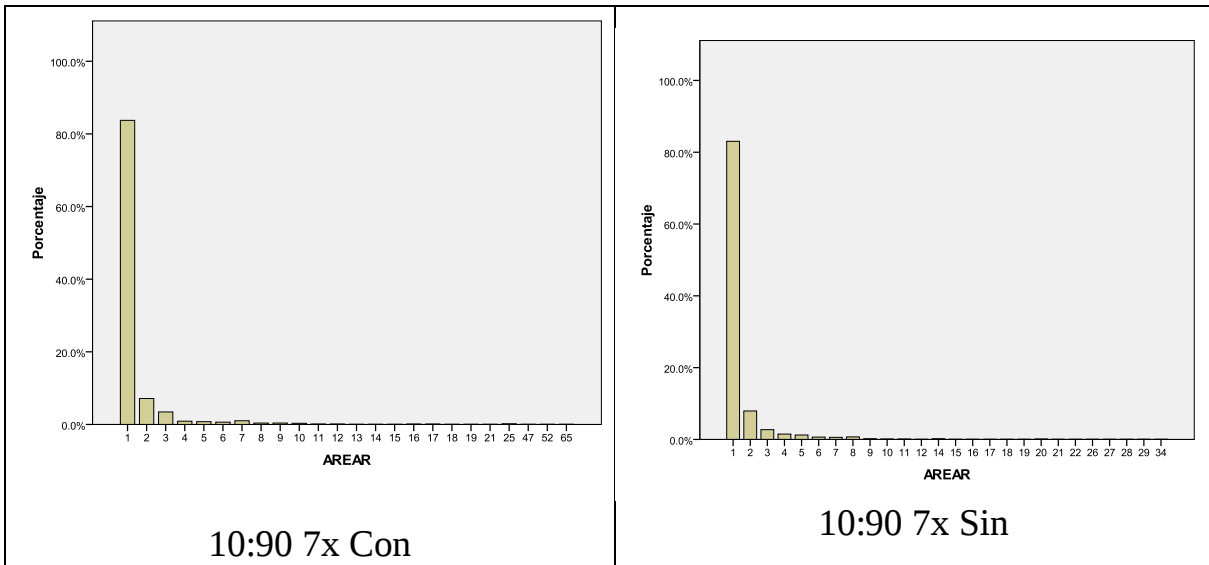
10:90 3x Sin



10:90 5x Con



10:90 5x Sin

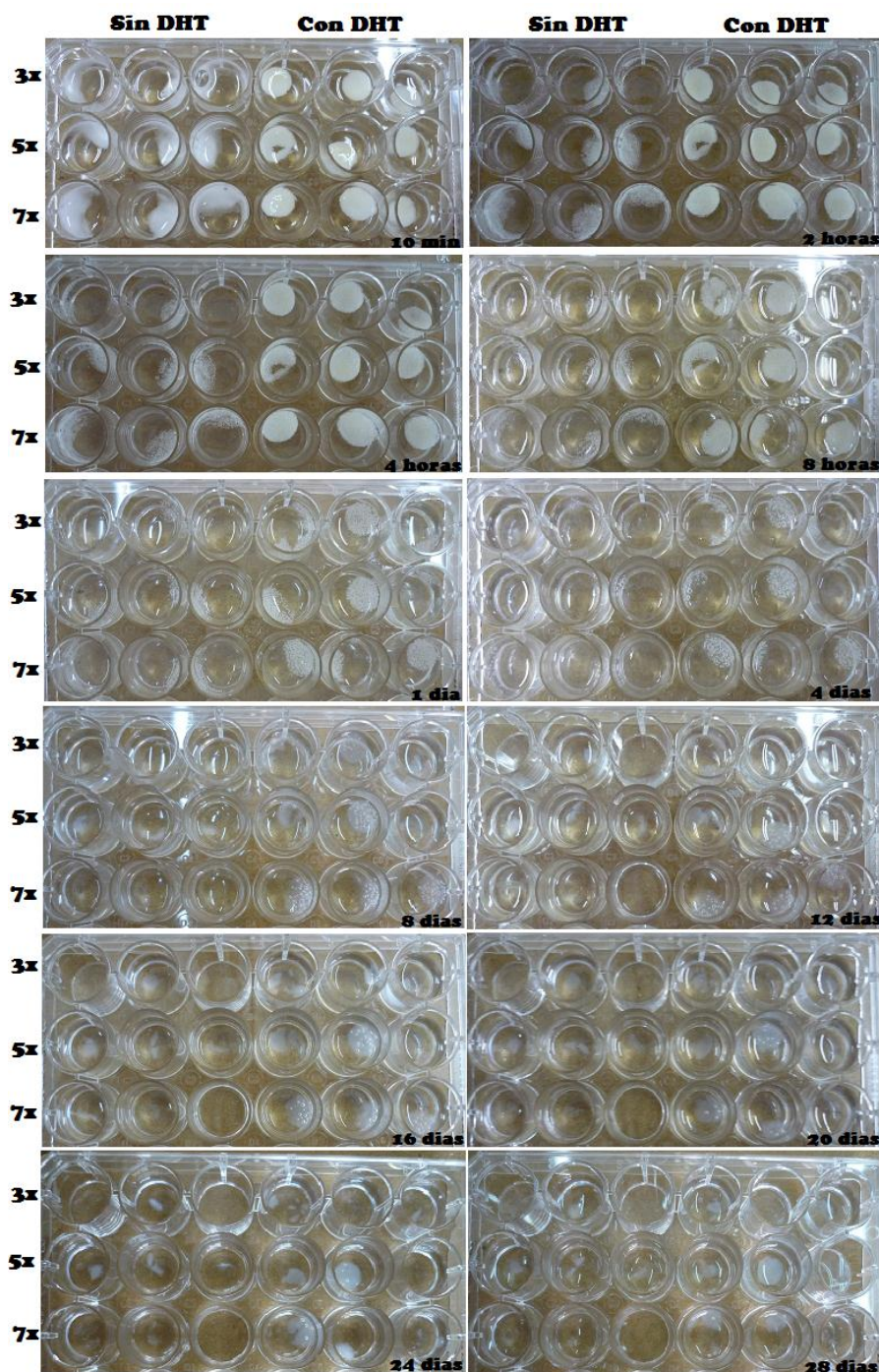


Anexo # 4

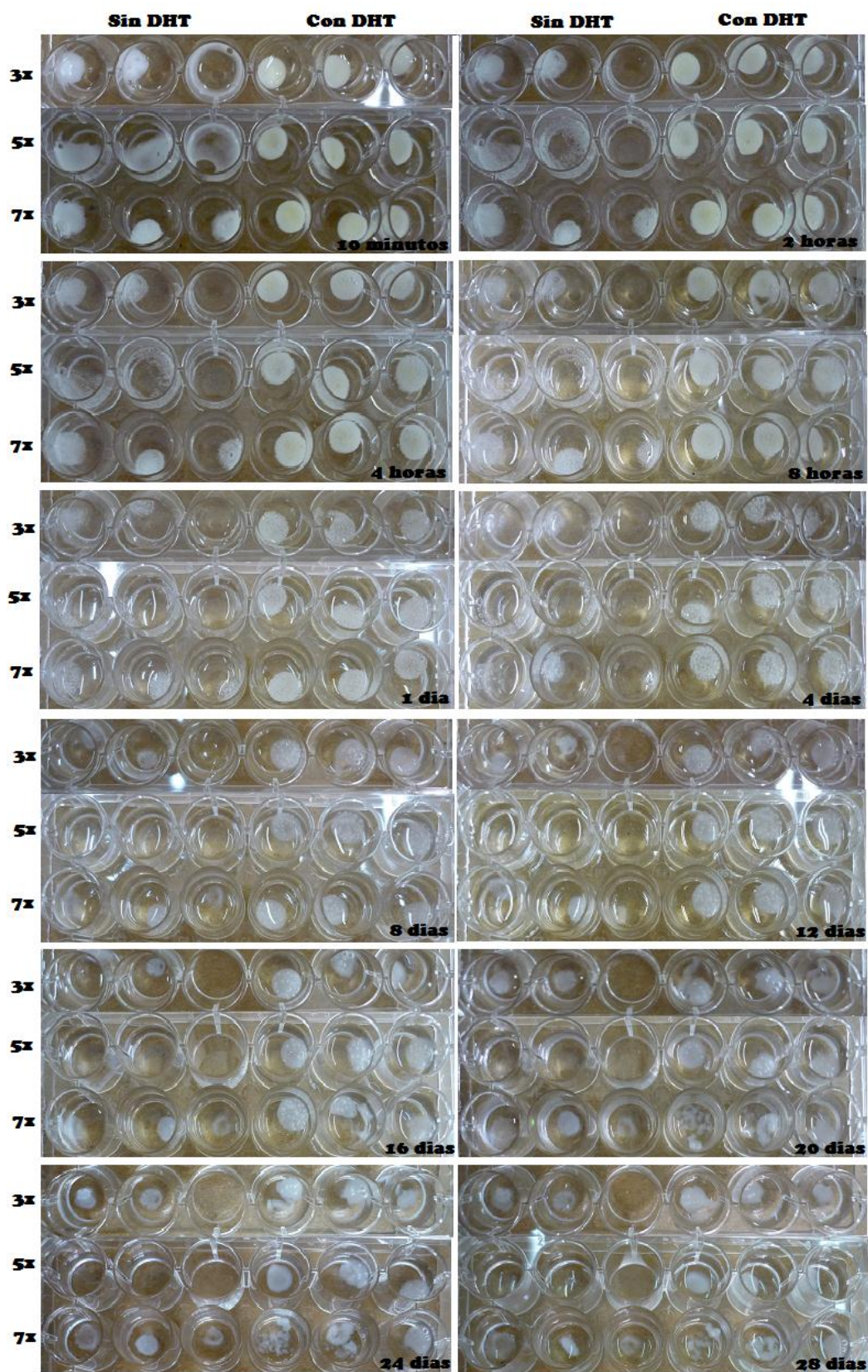
Ensayo de Insolubilidad de los Hidrogeles de PVA

Los hidrogeles de PVA en sus distintas proporciones (3:97, 5:95, 6:94, 8:92, 10:90) fueron colocados en agua destilada por 28 días y monitoreados en tiempos periódicos. Se obtuvieron los siguientes resultados.

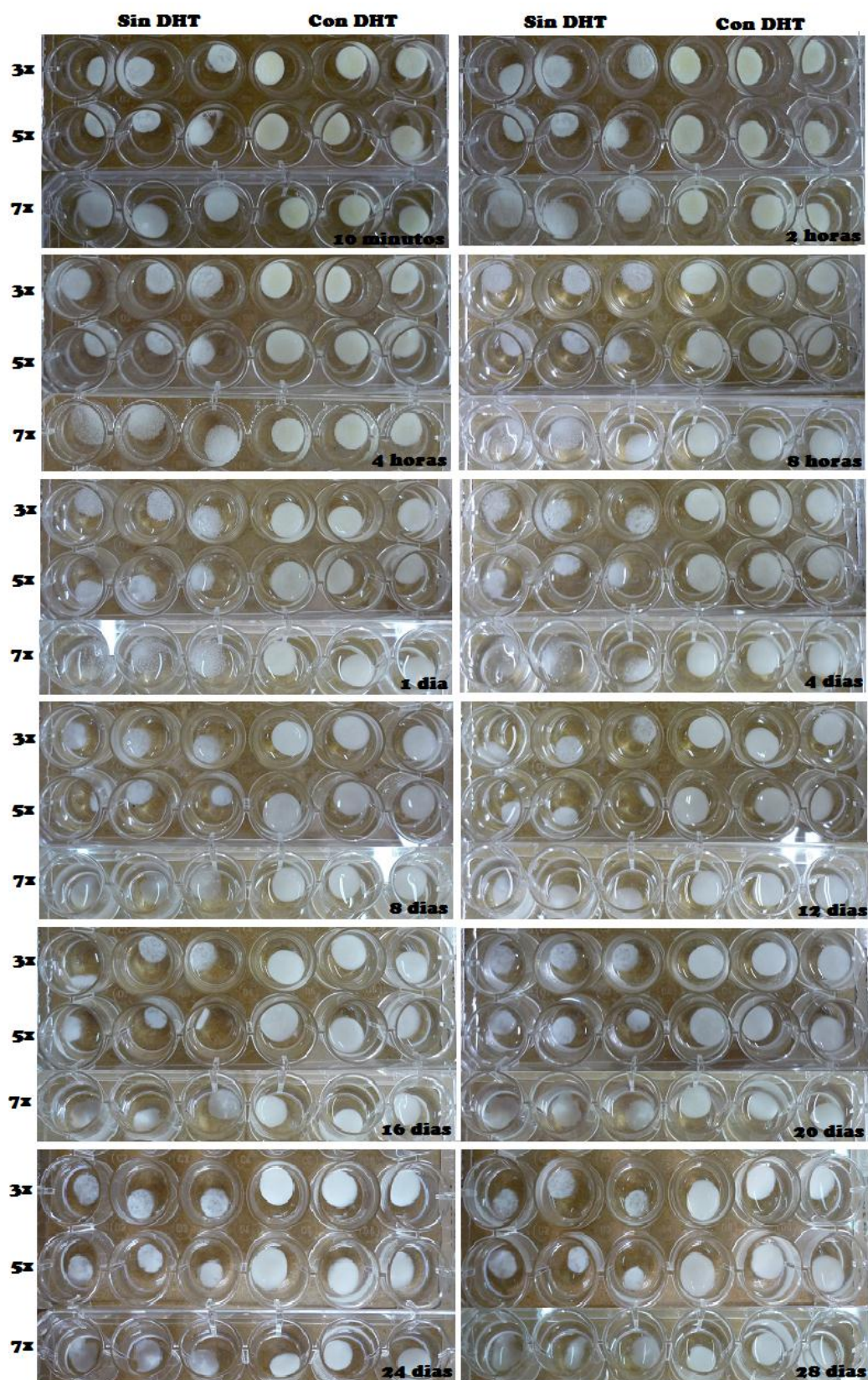
Tratamiento 3:97



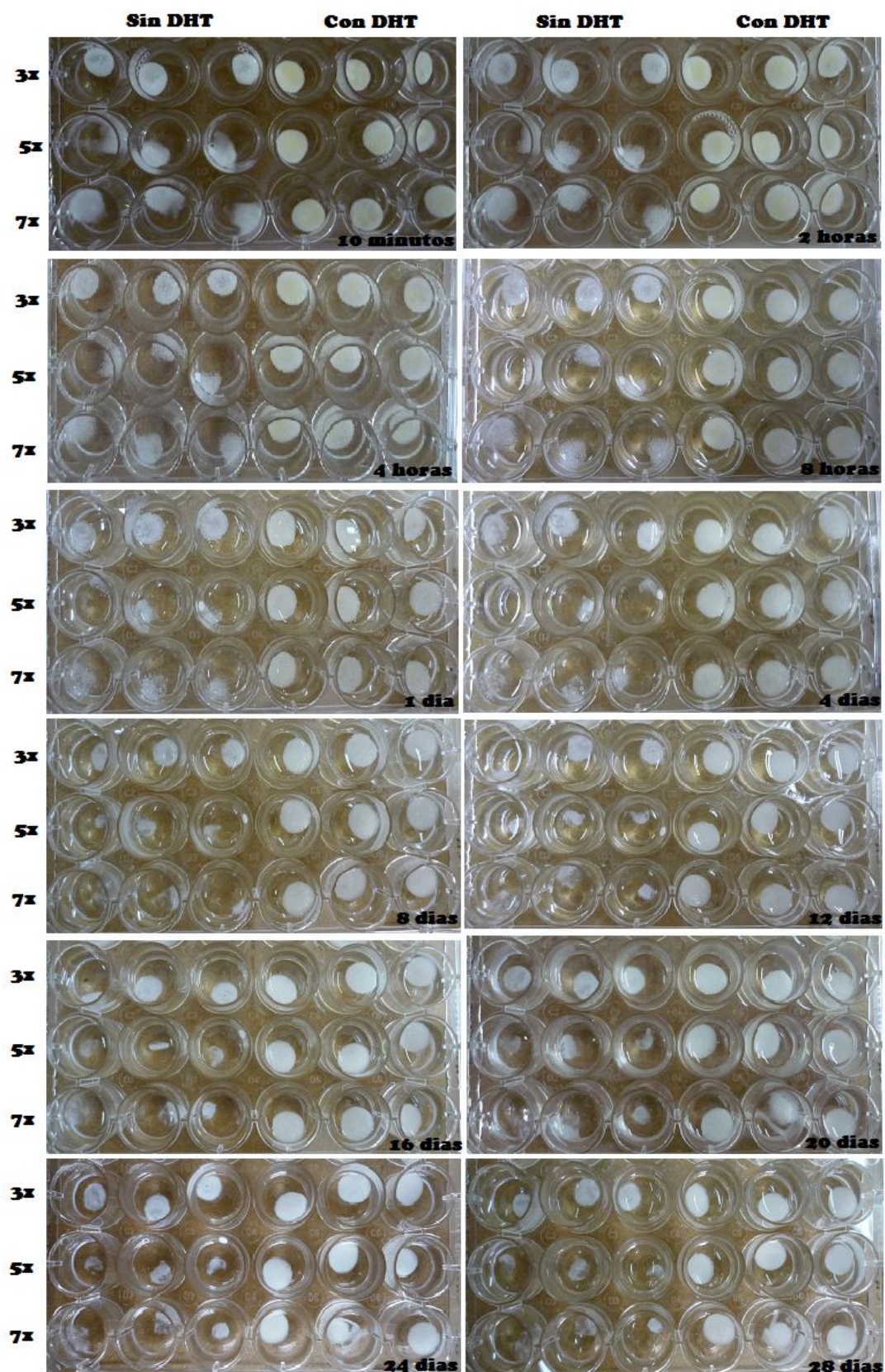
Tratamiento 5:95



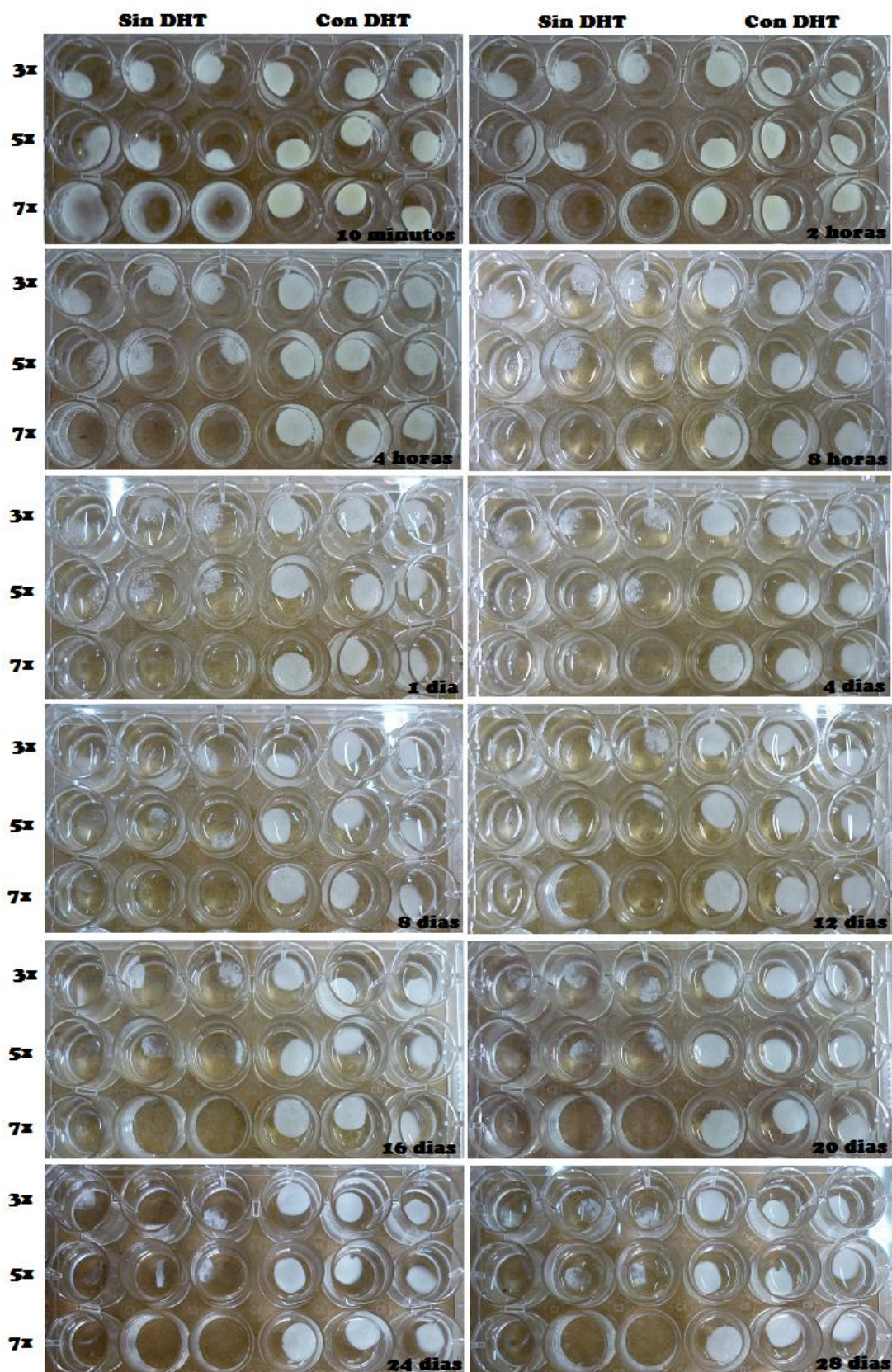
Tratamiento 6:94



Tratamiento 8:92



Tratamiento 10:90



Anexo # 5

Datos absorbancias disolución.

Medición por absorbancia la cantidad de PVA que pasaba a solución cuando los hidrogeles se incubaban en agua destilada en un tiempo determinado, la medición se realizó a las 2, 4, 8 horas y 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días.

TIEMPO 2 HORAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3	0,299	0,276	0,318	0,298
	5	0,267	0,753	0,335	0,452
	7	0,332	0,355	0,391	0,359
H3 L97 Con Horno	3	0,206	0,143	0,183	0,177
	5	0,270	0,222	0,264	0,252
	7	0,202	0,255	0,252	0,236
H5 L95 Sin Horno	3	0,239	0,234	0,419	0,297
	5	0,322	0,628	0,716	0,555
	7	0,232	0,228	0,209	0,223
H5 L95 Con Horno	3	0,203	0,200	0,183	0,195
	5	0,166	0,227	0,263	0,219
	7	0,193	0,205	0,189	0,196
H6 L94 Sin Horno	3	0,186	0,206	0,171	0,188
	5	0,202	0,217	0,239	0,219
	7	0,164	0,237	0,200	0,200
H6 L94 Con Horno	3	0,107	0,135	0,146	0,129
	5	0,246	0,212	0,215	0,224
	7	0,170	0,190	0,191	0,184
H8 L92 Sin Horno	3	0,264	0,205	0,278	0,249
	5	0,208	0,283	0,242	0,244
	7	0,328	0,334	0,329	0,330
H8 L92 Con Horno	3	0,200	0,184	0,204	0,196
	5	0,313	0,219	0,182	0,238
	7	0,192	0,209	0,230	0,210
H10 L90 Sin Horno	3	0,233	0,301	0,266	0,267
	5	0,303	0,327	0,335	0,322
	7	0,590	0,661	0,655	0,635
H10 L90 Con Horno	3	0,278	0,266	0,248	0,264
	5	0,190	0,204	0,259	0,218
	7	0,249	0,193	0,028	0,157

TIEMPO 4 HORAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3	0,343	0,409	0,399	0,384
	5	0,302	0,438	0,456	0,399
	7	0,418	0,471	0,481	0,457
H3 L97 Con Horno	3	0,296	0,278	0,292	0,289
	5	0,425	0,350	0,371	0,382
	7	0,271	0,351	0,375	0,332
H5 L95 Sin Horno	3	0,290	0,336	0,447	0,358
	5	0,499	0,544	0,609	0,551
	7	0,336	0,304	0,276	0,305
H5 L95 Con Horno	3	0,342	0,312	0,285	0,313
	5	0,315	0,305	0,347	0,322
	7	0,261	0,309	0,332	0,301
H6 L94 Sin Horno	3	0,261	0,300	0,252	0,271
	5	0,321	0,319	0,364	0,335
	7	0,330	0,298	0,257	0,295
H6 L94 Con Horno	3	0,183	0,249	0,257	0,230
	5	0,376	0,295	0,322	0,331
	7	0,231	0,340	0,286	0,286
H8 L92 Sin Horno	3	0,393	0,375	0,418	0,395
	5	0,317	0,298	0,350	0,322
	7	0,373	0,417	0,393	0,394
H8 L92 Con Horno	3	0,269	0,296	0,299	0,288
	5	0,314	0,311	0,315	0,313
	7	0,287	0,299	0,338	0,308
H10 L90 Sin Horno	3	0,333	0,390	0,381	0,368
	5	0,401	0,402	0,405	0,403
	7	0,639	0,675	0,629	0,648
H10 L90 Con Horno	3	0,439	0,459	0,464	0,454
	5	0,297	0,340	0,356	0,331
	7	0,319	0,313	0,339	0,324

TIEMPO 8 HORAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3	0,404	0,504	0,414	0,441
	5	0,368	0,599	0,548	0,505
	7	0,478	0,633	0,609	0,573
H3 L97 Con Horno	3	0,415	0,405	0,350	0,390
	5	0,469	0,474	0,541	0,495
	7	0,408	0,584	0,502	0,498
H5 L95 Sin Horno	3	0,415	0,553	0,499	0,489
	5	0,536	0,679	0,687	0,634
	7	0,323	0,388	0,368	0,360
H5 L95 Con Horno	3	0,503	0,504	0,401	0,469
	5	0,356	0,435	0,450	0,414
	7	0,422	0,364	0,430	0,405
H6 L94 Sin Horno	3	0,315	0,380	0,351	0,349
	5	0,340	0,440	0,367	0,382
	7	0,417	0,329	0,298	0,348
H6 L94 Con Horno	3	0,259	0,341	0,370	0,323
	5	0,372	0,400	0,366	0,379
	7	0,326	0,389	0,435	0,383
H8 L92 Sin Horno	3	0,423	0,466	0,514	0,468
	5	0,333	0,369	0,428	0,377
	7	0,497	0,465	0,456	0,473
H8 L92 Con Horno	3	0,335	0,537	0,530	0,467
	5	0,335	0,406	0,398	0,380
	7	0,401	0,421	0,492	0,438
H10 L90 Sin Horno	3	0,268	0,437	0,538	0,414
	5	0,477	0,570	0,541	0,529
	7	0,676	0,646	0,681	0,668
H10 L90 Con Horno	3	0,459	0,551	0,588	0,533
	5	0,382	0,366	0,417	0,388
	7	0,388	0,488	0,498	0,458

TIEMPO 4 DÍAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3	0,414	0,537	0,407	0,453
	5	0,576	0,529	0,660	0,588
	7	0,576	0,557	0,549	0,561
H3 L97 Con Horno	3	0,542	0,505	0,470	0,506
	5	0,480	0,858	0,622	0,653
	7	0,615	0,854	1,117	0,862
H5 L95 Sin Horno	3	0,702	0,613	0,419	0,578
	5	0,780	0,786	0,746	0,771
	7	0,551	0,648	0,509	0,569
H5 L95 Con Horno	3	0,752	0,638	0,661	0,684
	5	0,576	0,749	0,749	0,691
	7	0,537	0,571	0,598	0,569
H6 L94 Sin Horno	3	0,476	0,579	0,488	0,514
	5	0,819	0,794	0,686	0,766
	7	0,616	0,555	0,587	0,586
H6 L94 Con Horno	3	0,465	0,544	0,694	0,568
	5	0,473	0,490	0,646	0,536
	7	0,505	0,619	0,735	0,620
H8 L92 Sin Horno	3	0,730	0,816	0,949	0,832
	5	0,400	0,387	0,472	0,420
	7	0,739	0,971	0,843	0,851
H8 L92 Con Horno	3	0,794	0,661	0,780	0,745
	5	0,559	0,683	0,772	0,671
	7	0,666	0,782	1,055	0,834
H10 L90 Sin Horno	3	0,468	0,754	0,875	0,699
	5	0,611	0,609	0,651	0,624
	7	0,650	0,683	0,782	0,705
H10 L90 Con Horno	3	0,681	0,690	0,909	0,760
	5	0,431	0,547	0,698	0,559
	7	0,569	0,762	0,692	0,674

TIEMPO 1 DIA					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3	0,406	0,535	0,539	0,493
	5	0,566	0,591	0,633	0,597
	7	0,569	0,658	0,648	0,625
H3 L97 Con Horno	3	0,678	0,509	0,618	0,602
	5	0,517	0,698	0,599	0,605
	7	0,628	0,671	0,723	0,674
H5 L95 Sin Horno	3	0,616	0,464	0,477	0,519
	5	0,645	0,684	0,730	0,686
	7	0,568	0,590	0,412	0,523
H5 L95 Con Horno	3	0,738	0,607	0,513	0,619
	5	0,553	0,723	0,649	0,642
	7	0,634	0,577	0,557	0,589
H6 L94 Sin Horno	3	0,521	0,533	0,457	0,504
	5	0,685	0,633	0,562	0,627
	7	0,459	0,529	0,460	0,483
H6 L94 Con Horno	3	0,523	0,644	0,624	0,597
	5	0,480	0,505	0,505	0,497
	7	0,483	0,477	0,528	0,496
H8 L92 Sin Horno	3	0,516	0,524	0,690	0,577
	5	0,379	0,409	0,406	0,398
	7	0,693	0,632	0,477	0,601
H8 L92 Con Horno	3	0,526	0,499	0,581	0,535
	5	0,570	0,599	0,572	0,580
	7	0,648	0,661	0,709	0,673
H10 L90 Sin Horno	3	0,410	0,571	0,628	0,536
	5	0,582	0,602	0,616	0,600
	7	0,681	0,800	0,670	0,717
H10 L90 Con Horno	3	0,591	0,714	0,715	0,673
	5	0,417	0,550	0,565	0,511
	7	0,530	0,646	0,567	0,581

TIEMPO 8 DÍAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3	0,039	0,041	0,039	0,040
	5	0,051	0,047	0,044	0,047
	7	0,054	0,047	0,051	0,051
H3 L97 Con Horno	3	0,079	0,086	0,062	0,076
	5	0,071	0,068	0,040	0,060
	7	0,055	0,080	0,100	0,078
H5 L95 Sin Horno	3	0,104	0,097	0,045	0,082
	5	0,053	0,043	0,064	0,053
	7	0,058	0,056	0,038	0,051
H5 L95 Con Horno	3	0,128	0,107	0,047	0,094
	5	0,079	0,085	0,090	0,085
	7	0,062	0,071	0,076	0,070
H6 L94 Sin Horno	3	0,059	0,068	0,053	0,060
	5	0,068	0,065	0,070	0,068
	7	0,076	0,091	0,076	0,081
H6 L94 Con Horno	3	0,094	0,010	0,104	0,069
	5	0,112	0,088	0,107	0,102
	7	0,080	0,087	0,121	0,096
H8 L92 Sin Horno	3	0,054	0,078	0,071	0,068
	5	0,036	0,034	0,039	0,036
	7	0,067	0,052	0,045	0,055
H8 L92 Con Horno	3	0,088	0,091	0,099	0,093
	5	0,081	0,087	0,079	0,082
	7	0,110	0,070	0,122	0,101
H10 L90 Sin Horno	3	0,054	0,069	0,084	0,069
	5	0,050	0,061	0,058	0,056
	7	0,031	0,021	0,036	0,029
H10 L90 Con Horno	3	0,111	0,105	0,110	0,109
	5	0,062	0,069	0,063	0,065
	7	0,089	0,095	0,090	0,091

TIEMPO 12 DÍAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3		0,026		0,026
	5	0,028	0,026	0,063	0,039
	7	0,029	0,032		0,031
H3 L97 Con Horno	3	0,032	0,028	0,035	0,032
	5	0,029	0,031	0,027	0,029
	7	0,031	0,027	0,028	0,029
H5 L95 Sin Horno	3	0,029	0,027		0,028
	5	0,029	0,032	0,028	0,030
	7	0,015	0,016	0,014	0,015
H5 L95 Con Horno	3	0,041	0,038	0,031	0,037
	5	0,032	0,034	0,035	0,034
	7	0,021	0,019	0,022	0,021
H6 L94 Sin Horno	3	0,017	0,017	0,015	0,016
	5	0,016	0,015	0,015	0,015
	7	0,024	0,020	0,020	0,021
H6 L94 Con Horno	3	0,026	0,026	0,028	0,027
	5	0,029	0,026	0,023	0,026
	7	0,024	0,024	0,028	0,025
H8 L92 Sin Horno	3	0,020	0,017	0,024	0,020
	5	0,007	0,005	0,007	0,006
	7	0,005	0,003	0,002	0,003
H8 L92 Con Horno	3	0,021	0,021	0,017	0,020
	5	0,007	0,010	0,009	0,009
	7	0,012	0,012	0,016	0,013
H10 L90 Sin Horno	3	0,002	0,004	0,026	0,011
	5	0,003	0,004	0,008	0,005
	7	0,004		0,003	0,004
H10 L90 Con Horno	3	0,010	0,009	0,010	0,010
	5	0,008	0,011	0,006	0,008
	7	0,009	0,014	0,009	0,011

TIEMPO 16 DÍAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3		0,014		0,014
	5	0,014	0,014	0,015	0,014
	7	0,014	0,015		0,015
H3 L97 Con Horno	3	0,014	0,017	0,014	0,015
	5	0,013	0,014	0,013	0,013
	7	0,013	0,013	0,014	0,013
H5 L95 Sin Horno	3	0,013	0,014		0,014
	5	0,012	0,013		0,013
	7	0,012	0,013	0,012	0,012
H5 L95 Con Horno	3	0,013	0,013	0,013	0,013
	5	0,014	0,018	0,013	0,015
	7	0,013	0,011	0,012	0,012
H6 L94 Sin Horno	3	0,012	0,011	0,013	0,012
	5	0,011	0,010	0,009	0,010
	7	0,013	0,013	0,014	0,013
H6 L94 Con Horno	3	0,012	0,011		0,012
	5	0,015	0,018	0,016	0,016
	7	0,012	0,012	0,014	0,013
H8 L92 Sin Horno	3	0,013	0,013	0,021	0,016
	5	0,011	0,012	0,012	0,012
	7	0,010	0,011	0,013	0,011
H8 L92 Con Horno	3	0,013	0,013	0,012	0,013
	5	0,014	0,013	0,014	0,014
	7	0,015	0,012	0,012	0,013
H10 L90 Sin Horno	3	0,012	0,012	0,013	0,012
	5	0,011	0,012	0,011	0,011
	7	0,013			0,013
H10 L90 Con Horno	3	0,012	0,013	0,012	0,012
	5	0,012	0,012	0,013	0,012
	7	0,012	0,013	0,012	0,012

TIEMPO 20 DÍAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3		0,009		0,009
	5	0,012	0,009	0,008	0,010
	7	0,008	0,007		0,008
H3 L97 Con Horno	3	0,007	0,007	0,009	0,008
	5	0,010	0,008	0,007	0,008
	7	0,013	0,012	0,012	0,012
H5 L95 Sin Horno	3	0,016	0,012		0,014
	5	0,012	0,006		0,009
	7	0,010	0,007	0,015	0,011
H5 L95 Con Horno	3	0,012	0,012	0,012	0,012
	5	0,012	0,007	0,004	0,008
	7	0,014	0,013	0,008	0,012
H6 L94 Sin Horno	3	0,007	0,009	0,004	0,007
	5	0,003	0,007	0,005	0,005
	7	0,002	0,001	0,002	0,002
H6 L94 Con Horno	3	0,008	0,017	0,009	0,011
	5	0,006	0,004	0,004	0,005
	7	0,007	0,004	0,001	0,004
H8 L92 Sin Horno	3	0,001	0,005	0,001	0,002
	5	0,001	0,004	0,001	0,002
	7	0,007	0,005	0,005	0,006
H8 L92 Con Horno	3	0,001	0,002	0,001	0,001
	5	0,004	0,003	0,009	0,005
	7	0,005	0,009	0,009	0,008
H10 L90 Sin Horno	3	0,009	0,008	0,009	0,009
	5	0,010	0,003	0,004	0,006
	7	0,010			0,010
H10 L90 Con Horno	3	0,008	0,008	0,009	0,008
	5	0,009	0,010	0,004	0,008
	7	0,006	0,010	0,010	0,009

TIEMPO 24 DÍAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3		0,005		0,005
	5	0,000	0,001	0,007	0,003
	7	0,003	0,005		0,004
H3 L97 Con Horno	3	0,006	0,001	0,005	0,004
	5	0,002	0,005	0,001	0,003
	7	0,006	0,007	0,006	0,006
H5 L95 Sin Horno	3	0,000	0,003		0,002
	5	0,002	0,002		0,002
	7	0,007	0,001	0,004	0,004
H5 L95 Con Horno	3	0,004	0,007	0,005	0,005
	5	0,006	0,006	0,007	0,006
	7	0,004	0,002	0,002	0,003
H6 L94 Sin Horno	3	0,000	0,003	0,001	0,001
	5	0,000	0,002	0,002	0,001
	7	0,008	0,007	0,009	0,008
H6 L94 Con Horno	3	0,003	0,004	0,002	0,003
	5	0,006	0,011	0,010	0,009
	7	0,013	0,013	0,012	0,013
H8 L92 Sin Horno	3	0,013	0,014	0,010	0,012
	5	0,014	0,009	0,013	0,012
	7	0,011	0,013	0,013	0,012
H8 L92 Con Horno	3	0,012	0,012	0,017	0,014
	5	0,015	0,013	0,013	0,014
	7	0,011	0,006	0,007	0,008
H10 L90 Sin Horno	3	0,011	0,008	0,007	0,009
	5	0,009	0,011	0,012	0,011
	7	0,006			0,006
H10 L90 Con Horno	3	0,012	0,011	0,006	0,010
	5	0,010	0,013	0,011	0,011
	7	0,007	0,010	0,010	0,009

TIEMPO 28 DÍAS					
Tratamiento	Ciclo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
H3 L97 Sin Horno	3		0,042		0,042
	5	0,038	0,037	0,037	0,037
	7	0,043	0,037		0,040
H3 L97 Con Horno	3	0,046		0,041	0,044
	5	0,036	0,041		0,039
	7	0,041	0,037	0,042	0,040
H5 L95 Sin Horno	3	0,041	0,041		0,041
	5	0,042	0,036		0,039
	7	0,040	0,040	0,040	0,040
H5 L95 Con Horno	3	0,036	0,036	0,035	0,036
	5	0,034	0,041	0,039	0,038
	7	0,035	0,041	0,040	0,039
H6 L94 Sin Horno	3	0,039	0,039	0,038	0,039
	5	0,038	0,039	0,036	0,038
	7	0,037	0,036	0,030	0,034
H6 L94 Con Horno	3	0,038	0,038	0,034	0,037
	5	0,034	0,038	0,036	0,036
	7	0,034	0,034	0,036	0,035
H8 L92 Sin Horno	3	0,037	0,036	0,037	0,037
	5	0,029	0,035		0,032
	7	0,014	0,015	0,015	0,015
H8 L92 Con Horno	3	0,032	0,035	0,035	0,034
	5	0,016	0,017	0,016	0,016
	7	0,015	0,014	0,014	0,014
H10 L90 Sin Horno	3	0,013	0,013	0,012	0,013
	5	0,022	0,024	0,022	0,023
	7	0,021			0,021
H10 L90 Con Horno	3	0,013	0,015	0,023	0,017
	5	0,023	0,023	0,023	0,023
	7	0,023	0,023	0,023	0,023

Anexo # 6

Tasa de hinchamiento.

Datos de peso de las muestras en seco y después de ser sumergidas en agua por 4 horas.

Con tratamiento dehidrotermal

Ciclo	Tratamiento	3 HMW Sin C/DC (mg)			5HMW Sin C/DC (mg)			6 HMW Sin C/DC (mg)			8 HMW Sin C/DC (mg)			10 HMW Sin C/DC (mg)		
Muestra		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
3x	Antes	19	24	19	30	24	19	26	26	23	29	32	34	25	28	30
	Despues	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta
Tasa de hinchamiento Q																
Promedio Q																
S.D.																
5x	Antes	28	28	25	33	32	28	31	31	29	22	21	21	29	28	26
	Despues	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta
Tasa de hinchamiento Q																
Promedio Q																
S.D.																
7x	Antes	26	24	26	30	29	20	28	27	25	33	29	26	33	29	30
	Despues	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta	Disuelta
Tasa de hinchamiento Q																
Promedio Q																
S.D.																

Sin tratamiento dehidrotermal

Ciclo	Tratamiento	3 HMW Con C/DC (mg)			5HMW Con C/DC (mg)		
Muestra		1	2	3	1	2	3
3x	Antes	29	25	20	35	27	24
	Despues	Rota	Rota	Rota	239	202	176
Tasa de hinchamiento Q					5,828571429	6,4814815	6,333333
Promedio Q					6,214462081		
S.D.					0,342302009		
5x	Antes	26	32	29	30	34	30
	Despues	Rota	Rota	Rota	213	221	217
Tasa de hinchamiento Q					6,1	5,5	6,233333
Promedio Q					5,944444444		
S.D.					0,390631018		
7x	Antes	30	32	30	32	31	27
	Despues	183	182	183	219	202	193
Tasa de hinchamiento Q		5,1	4,688	5,1	5,84375	5,516129	6,148148
Promedio Q		4,9625			5,83600906		
S.D.		0,238156986			0,316080658		

6 HMW Con C/DC (mg)			8 HMW Con C/DC (mg)			10 HMW Con C/DC (mg)		
1	2	3	1	2	3	1	2	3
33	33	31	35	31	32	35	33	31
303	285	278	231	209	217	233	211	199
8,181818	7,636363	7,967741935	5,6	5,741935484	5,78125	5,657142857	5,393939394	5,419354839
7,928641251			5,707728495			5,490145697		
0,27482142			0,095344005			0,145181007		
30	27	29	34	34	29	28	27	27
320	251	257	234	247	206	218	200	183
9,666667	8,296296296	7,862068966	5,882352941	6,264705882	6,103448276	6,785714286	6,407407407	5,777777778
8,608343976			6,083502366			6,323633157		
0,941898897			0,191955261			0,509163623		
29	30	32	38	30	35	32	33	29
238	239	255	259	214	250	276	245	215
7,206897	6,966666667	6,96875	5,815789474	6,133333333	6,142857143	7,625	6,424242424	6,413793103
7,047437739			6,030659983			6,821011843		
0,138099311			0,186144239			0,696293771		

Anexo # 7

Protocolo para la extracción de colágeno

Modificado de Gross, J., Highberger, J.H., Schmit, F.O. 1955. Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS 41: 1-7.

1. Tomar 50g del tejido y cortarlo lo mas pequeño posible, posterior a esto mezclarlo con 200 mL de agua destilada y licuarlo hasta que el tejido quede en pequeñas fibras
2. Llevar las muestras a -20°C por toda una noche, al siguiente día poner las muestras a -70°C por 15 minutos y luego liofilizar
3. Terminada la liofilización llevar la piel nuevamente a -70°C por un día, seguido de esto licuar nuevamente el tejido dejando como polvo y/o pequeños trozos de tejido.
4. Estas fibras se rehidratan en 150mL de NaCl 1M y se agita por 24 horas a 4°C
5. Terminada la agitación la muestra se pasa por un filtro de tela presionando la piel para así obtener la mayor cantidad de extracto posible. El extracto obtenido se recoge y se almacena a -20°C por separado, mientras que el tejido tratado se colocaba nuevamente en 100mL de NaCl 1M y se repite el proceso anterior. Se realizaron 3 extracciones del mismo tejido.
6. Terminados todos los extractos, estos se centrifugan a 80.000g por 1 hora, se recupera el sobrenadante.
7. La muestra obtenida se dializa en agua destilada a 4° C por 3 días con repetidos cambios de agua, el ultimo cambio de agua se hace por agua desionizada.
8. Las muestras dializadas se centrifugan nuevamente a 14.000g por 20 minutos a 4°C
9. Se recuperar los pellets y se conservan -20°C, cuando se recogen todos son llevados a -70°C por 15 minutos, se liofilizan nuevamente y se almacena a -20°C.

Anexo # 8

Cuantificación por el método Bradford del Colágeno

Medición para las soluciones para el colágeno extraído en el laboratorio y el control positivo que corresponde a colágeno tipo I Sigma

CUANTIFICACION DE PROTEINAS							
Metodo Bradford							
Reaccion	10µL Muestra						
	20µL NaOH 1M						
	200 µL Azul Comassie						
Lectura en el espectrofotometro a 630nm						Y= 0,4998x-0,3994	
						Concentracion	
Muestra	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Abs Corregida	µg/10µL	µg/µL
HBSS	0,244	0,245	0,242	0,244			
Colageno Extracto	0,707	0,808	0,826	0,780	0,537	1,873	0,187
Colageno Sigma	0,351	0,368	0,336	0,352	0,108	1,015	0,102

Anexo # 9

Protocolo para el corrido electroforético

1. Se hace el corrido en dos fase por consiguiente se prepara un gel de concentración y un gel de separación. Inicialmente se prepara el gel de separación que será en gradiente así: T:12, C:5 y T:5, C5

Reactivo	Light Sln (μL)	Dense Sln (μL)
Milli Q	763,125	654
1,5M Tris-Cl pH 8,8	375	375
Glicerol	150	150
SDS 10%	15	15
Temed 10%	7,5	7,5
APS 10%	7,5	7,5
Mix Ready T:40 C:2	181,875	291
Valor Total	1500	1500

y luego se hace el gel de concentración T:3,6 C:2,6 así:

Reactivo	Cantidad μL
Acrilamida 40%	135
Bisacrilamida 2%	68
Buffer Tris-Cl 0,05M pH 6,8	187
SDS 10%	15
Milli Q	1087
Temed 10%	7
APS 10%	7
Total	1,5mL

2. Las muestras se sirven 1μg por pozo según los resultados de la cuantificación de proteínas y se mezcla con el buffer de carga. Se inicia el corrido Entrada 25mA, Gel de concentración 16mA y Gel de separación 3mA.
3. Terminado el corrido el gel se tiñe con comassie para ver las bandas obtenidas.

Anexo #10

Protocolo Dot Blot

1. Tomar una membrana de nitrocelulosa, cortar según el área necesaria para hacer la reacción y delimitar el área en donde se va aplicar y reaccionar cada muestra.
2. Activar la membrana sumergiéndola 5 minutos en metanol y al sacarla antes de que se seque agregar 2µL de muestra en el centro de cada espacio delimitado lentamente para minimizar el área que abarca la muestra.
3. Dejar que la membrana se seque.
4. Bloquear los sitios no específicos sumergiendo la membrana en 5% BSA en TBS- por 1 hora.
5. Incubar con el anticuerpo primario COL1A1(D-13) goat polyclonal IgG (200µg/ml) en dilución 1:200, disuelto en BSA/TBS-T por 1 hora agitación constante.
6. Lavar 3 veces con TBS-T cada lavado 5 minutos.
7. Incubar con el anticuerpo secundario Anti-Goat IgG-Alkaline Phosphatase producido en conejo A4187 en dilución 1:30.000 disuelto en BSA/TBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante.
8. Lavar 3 veces con TBS-T, el primer lavado con una duración de 15 minutos y los dos siguientes cada uno 5 minutos, luego una vez por 5 minutos con TBS.
9. Agregar el sustrato BCIP/NBT (Tabletas Sigma B5655) hasta que se revele un precipitado no soluble color negro – morado.
10. Lavar con agua desionizada.
11. Secar y almacenar en oscuridad.

Anexo # 11

Protocolo de elaboración del hidrogel compuesto por PVA – Colageno tipo I – Apatita Carbonatada

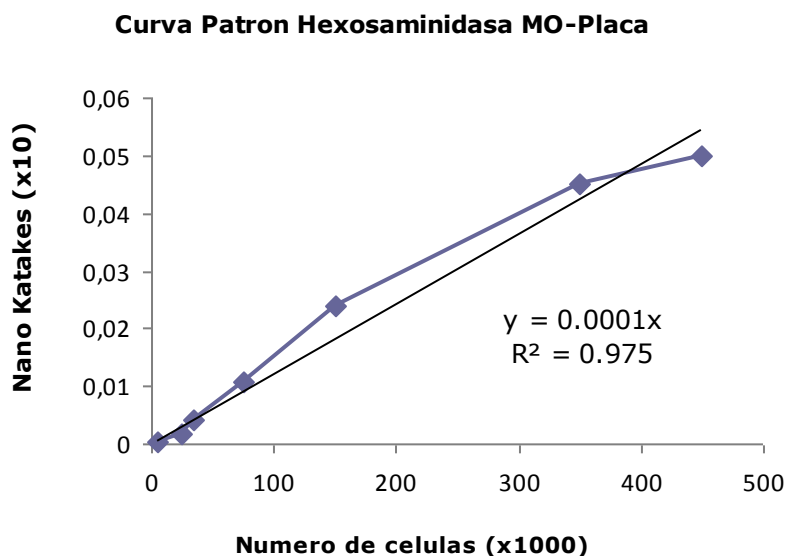
1. Lo primero que se debe realizar son las soluciones stock de los componentes, estas son PVA al 14% (94% LMW + 6%HMW) en agua destilada, CAp 3,6% en Citrato de sodio 16mM y Colageno 2,4% en HCL 0,01M dializado contra Citrato de sodio 300mM.
2. Teniendo listas las soluciones lo que se hace es mezclar la solución de PVA y la solución de CAp en citrato previamente sonicado y se deja en agitación toda la noche.
3. Al siguiente día realizar 7 ciclos de congelación y descongelación a -70°C por 45 minutos y 45°C (baño maría con agitación) por 15 minutos.
4. Terminado este proceso la mezcla de PVA y CAp (que se encuentra a 45°C) se mezcla con la solución de Colágeno (que fue precalentada y homogenizada por agitación a la misma temperatura) y se agita por 10 minutos hasta homogenizar totalmente y se sirve en los recipientes dispuestos para contener las muestras.
5. Cuando ya todas están servidas se colocan en una caja de icopor y se incluyen en el sistema de aislamiento de frio para su lenta congelación y la caja del sistema es puesta a -20°C durante 24 horas.
6. Cuando el tiempo de congelación termina las muestras se sacan del congelador a -20°C y se llevan por 15 minutos al congelador de -70°C y luego al liofilizador por 2 días o hasta que las muestras estén totalmente secas.
7. Y por ultimo las muestras son horneadas por 24 horas en vacío a 130°C.

Anexo # 12

Curva estándar de actividad hexosaminidasa de células de médula ósea sobre placa de cultivo

Datos por triplicado de nKats de actividad hexosaminidasa y número de células de médula ósea sobre placa de cultivo con los que se realizó la curva de estandarización.

No Cel x1000	nKats 1	nKats 2	nKats 3	Promedio nKats	Prom nKats/100
5	0,01660	0,02600	0,01660	0,01973	0,0002
25	0,03100	0,03400	0,03600	0,03367	0,0003
35	0,04800	0,05800	0,05600	0,05400	0,0005
50	0,09100	0,10200	0,10000	0,09767	0,0010
75	0,10700	0,12800	0,11900	0,11800	0,0012
100	0,16900	0,17600	0,15600	0,16700	0,0017
150	0,23100	0,25600	0,22600	0,23767	0,0024
250	0,38400	0,38600	0,41200	0,39400	0,0039
350	0,44600	0,44200	0,41600	0,43467	0,0043
450	0,46500	0,49800	0,48200	0,48167	0,0048



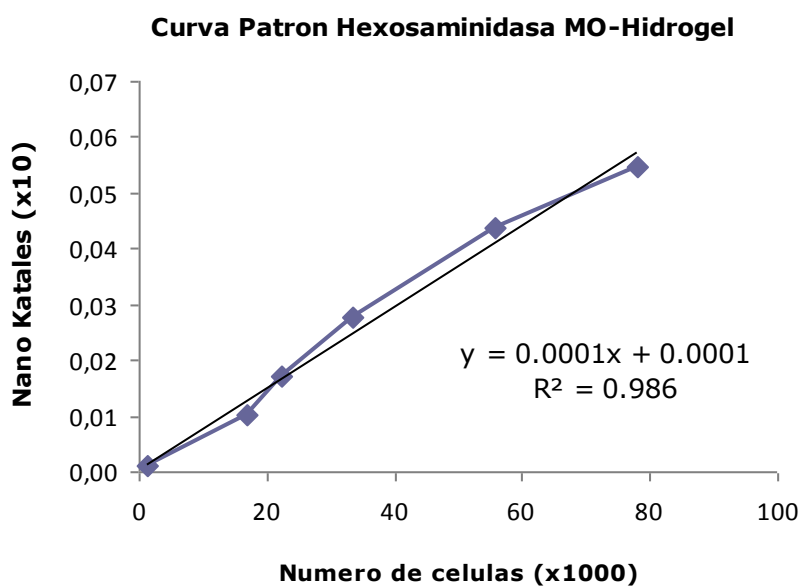
Curva de estandarización de número de células de médula ósea vs. actividad hexosaminidasa en nKats con su respectiva ecuación y R^2 .

Anexo # 13

Curvas estándar de actividad hexosaminidasa de células de médula ósea sobre hidrogel PVA-Col I-CAp.

Datos por triplicado de nKats de actividad hexosaminidasa y número de células de médula ósea sobre hidrogel PCA con los que se realizó la curva de estandarización.

No Cel x1000	nKats 1	nKats 2	nKats 3	Promedio nKat	Prom nKat x10
1	0,000177	0,000123	0,000047	0,00012	0,0012
6	0,002342	0,001598	0,001781	0,00191	0,0191
8	0,002212	0,002783	0,001146	0,00205	0,0205
11	0,002363	0,003580	0,001598	0,00251	0,0251
17	0,000866	0,000952	0,001200	0,00101	0,0101
22	0,000640	0,002245	0,002255	0,00171	0,0171
33	0,002277	0,004151	0,001868	0,00277	0,0277
56	0,004711	0,004151	0,004209	0,00436	0,0436
78	0,009095	0,001458	0,005842	0,00547	0,0547
100	0,003634	0,000029	0,003914	0,00253	0,0253



Curva de estandarización de número de células de médula ósea sobre hidrogel PCA vs. Actividad hexosaminidasa en nKats con su respectiva ecuación y R^2 .

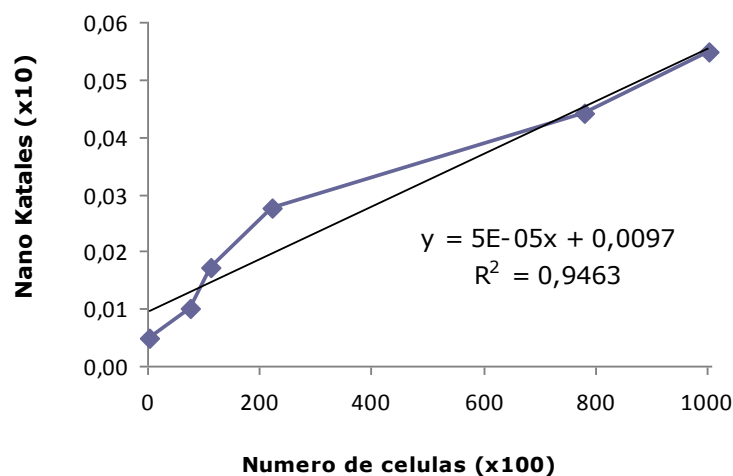
Anexo # 14

Curvas estándar de actividad hexosaminidasa de células de línea de pre-osteoblastos ATCC sobre hidrogel PVA-Col I-CAp.

Datos por triplicado de nKats de actividad hexosaminidasa y número de células de la línea de pre-osteoblastos ATCC sobre hidrogel PCA con los que se realizó la curva de estandarización.

No Cel x1000	nKats 1	nKats 2	nKats 3	Promedio nKats	Promedio nKats x10
2	0,000392	0,000554	0,000467	0,00047	0,00471
6	0,002342	0,001598	0,002148	0,00203	0,02029
11	0,002212	0,002783	0,001146	0,00205	0,02047
33	0,002363	0,003580	0,001598	0,00251	0,02514
78	0,000866	0,000952	0,001200	0,00101	0,01006
112	0,000640	0,002245	0,002255	0,00171	0,01713
223	0,002277	0,004151	0,001868	0,00277	0,02765
781	0,004711	0,004151	0,004388	0,00442	0,04417
1004	0,009095	0,001458	0,005842	0,00547	0,05465
1115	0,003634	0,003192	0,003914	0,00358	0,03580

Curva Patron Hexosaminidasa ATCC-Hidrogel



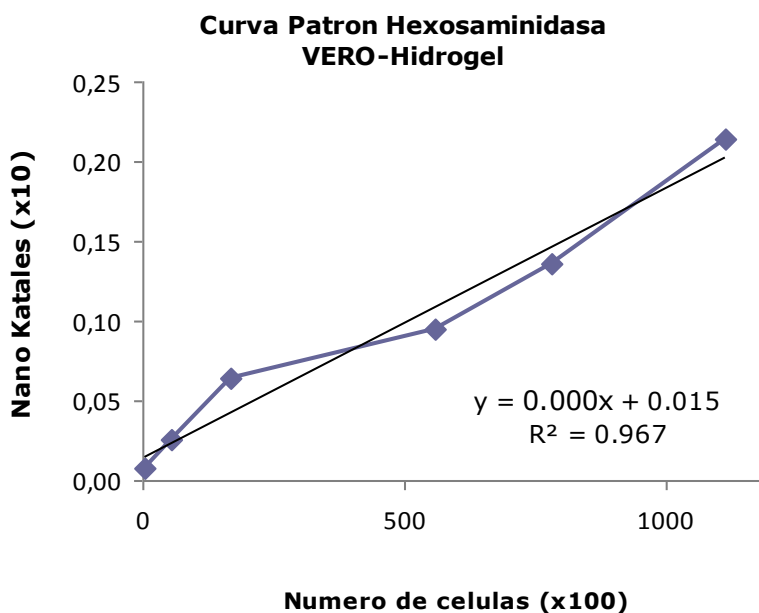
Curva de estandarización de número de células de la línea de osteoblastos ATCC sobre hidrogel PCA vs. actividad hexosaminidasa en nKats con su respectiva ecuación y R^2 .

Anexo # 15

Curvas estándar de actividad hexosaminidasa de células de línea VERO sobre hidrogel PVA-Col I-CAp.

Datos por triplicado de nKats de actividad hexosaminidasa y número de células de la línea VERO sobre hidrogel PCA con los que se realizó la curva de estandarización.

No Cel x1000	nKats 1	nKats 2	nKats 3	Promedio nKats	Promedio nKats x10
2	0,001467	0,000174	0,00053	0,00072	0,0072
11	0,003438	0,003793	0,001952	0,00306	0,0306
56	0,002921	0,002146	0,002598	0,00256	0,0256
167	0,006378	0,0057	0,007315	0,00646	0,0646
558	0,008737	0,009803	0,009965	0,00950	0,0950
781	0,013325	0,013842	0,013713	0,01363	0,1363
1115	0,019594	0,020305	0,024214	0,02137	0,2137



Curva de estandarización de número de células de la línea VERO sobre hidrogel PCA vs. Actividad hexosaminidasa en nKats con su respectiva ecuación y R^2 .

Anexo # 16

Datos de absorbancias y cálculos para graficar los datos de actividad Hexosaminidasa para conteo celular

CONTEO CELULAR												
Actividad Hexosaminidasa												
Lectura a 405 nm												
Volumen de medida 200µL												
Blanco 400µL sustrato + 600µL Stopper				0,000			*Dilucion 1/100			*Dilucion 1/100		
Reaccion 1h							Reaccion 1h			Reaccion 20 min		
Medula Osea Placa				0 dias			10 dias			20 dias		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3	
Blanco	0,000	0,000	0,000		0,097	0,100	0,066		0,000	0,000	0,000	
Sin Factores	0,657	0,664	0,713		0,221	0,215	0,180		0,106	0,047	0,032	
Con Factores	0,686	0,662	0,573		0,174	0,158	0,193		0,212	0,075	0,079	
										35 dias		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3	
Blanco	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	
Sin Factores	0,657	0,664	0,713		0,221	0,215	0,180		0,106	0,047	0,032	
Con Factores	0,686	0,662	0,573		0,174	0,158	0,193		0,212	0,075	0,079	
Medula Osea Hidrogel				0 dias			10 dias			20 dias		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3	
Blanco	0,082	0,120	0,122		0,048	0,057	0,023		0,000	0,000	0,000	
Sin Factores	0,400	0,452	0,306		0,296	0,168	0,139		0,017	0,110	0,020	
Con Factores	0,300	0,402	0,344		0,516	0,494	0,310		0,040	0,039	0,050	
										35 dias		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3	
Blanco	0,082	0,120	0,122		0,048	0,057	0,023		0,000	0,000	0,000	
Sin Factores	0,400	0,452	0,306		0,296	0,168	0,139		0,017	0,110	0,020	
Con Factores	0,300	0,402	0,344		0,516	0,494	0,310		0,040	0,039	0,050	
ATCC				0 dias			10 dias			20 dias		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3	
OH Con Factores	0,508	0,527	0,717		0,232	0,287	0,329		0,134	0,080	0,049	
VERO Sin Factores	1,107	1,205	1,577		0,237	0,236	0,251		0,049	0,173	0,130	

Hexosaminidasa		Sin Factores				
Dias Cultivo	MO PL SF	SD 1	MO HG SF	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
0	123	17	29	13	19,2	14,7
10	81	13	23	10	14,7	11,3
20	77	35	21	20	39,6	22,6
35	594	67	100	54	75,8	61,1

Hexosaminidasa		Con Factores				
Dias Cultivo	MO PL CF	SD 1	MO HG CF	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
0	115	13	18	4	14,5	4,5
10	68	8	61	18	8,5	20,7
20	69	16	19	10	18,1	11,3
35	266	36	95	49	40,7	56,0

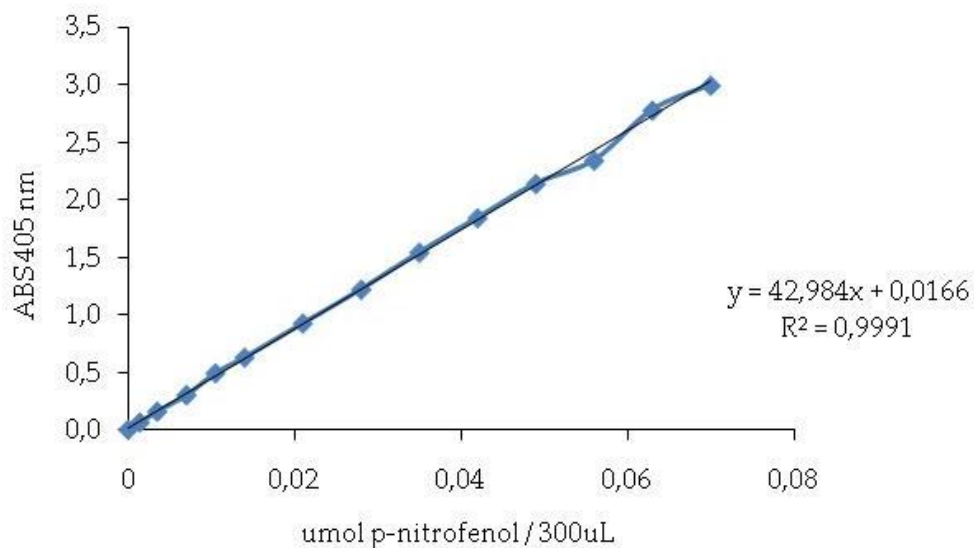
Hexosaminidasa		Con Factores				
Dias Cultivo	MO PL CF	SD 1	MO HG CF	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
0	115	13	18	4	14,5	4,5
10	68	8	61	18	8,5	20,7
20	69	16	19	10	18,1	11,3
35	266	36	95	49	40,7	56,0

Anexo # 17

Curvas estándar de *p*-nitrofenol-fosfato para APL

Datos de absorbancia por triplicado y μ moles de *p*-nitrofenol con los que se realizó la curva de estandarización.

umol <i>p</i> -nitrofenol	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	ABS corregida
0	0,210	0,237	0,222	0,223	0
0,001	0,282	0,290	0,290	0,287	0,064
0,004	0,363	0,412	0,373	0,383	0,160
0,007	0,505	0,538	0,533	0,525	0,302
0,011	0,725	0,721	0,700	0,715	0,492
0,014	0,839	0,878	0,840	0,852	0,629
0,021	1,139	1,179	1,129	1,149	0,926
0,028	1,433	1,470	1,430	1,444	1,221
0,035	1,736	1,784	1,780	1,767	1,544
0,042	2,073	2,072	2,053	2,066	1,843
0,049	2,326	2,397	2,369	2,364	2,141
0,056	2,657	2,362	2,680	2,566	2,343
0,063	3,001	2,982	3,025	3,003	2,780
0,070	3,226	3,253	3,182	3,220	2,997



Curva de estandarización de μ moles de *p*-nitrofenol vs. ABS con su respectiva ecuación y R^2 .

Anexo # 18

Datos de absorbancias y cálculos para graficar los datos correspondientes a Actividad Fosfatasa

Alcalina

ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA APL												
Lectura a 405 nm												
Volumen de medida 200µL												
Blanco 400µL sustrato + 200µL Stopper 0,000												
Medula Osea Placa				0 dias			10 dias			20 dias		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3				Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2
Blanco	0,040	0,059	0,032		0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,018	0,032	0,040
Sin Factores	0,073	0,053	0,026		0,181	0,267	0,209	0,483	0,342	0,411	0,637	0,603
Blanco	0,028	0,031	0,029		0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,082	0,047	0,063
Con Factores	0,054	0,118	0,072		0,193	0,513	0,501	0,599	0,340	0,336	0,593	0,573
Medula Osea Hidrogel				0 dias			10 dias			20 dias		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3	
Blanco	0,056	0,042	0,062		0,011	0,000	0,000	0,000	0,053	0,029	0,017	0,106
Sin Factores	0,118	0,104	0,100		0,005	0,009	0,008	0,022	0,046	0,037	0,090	0,087
Blanco	0,056	0,042	0,062		0,038	0,000	0,004	0,006	0,027	0,056	0,029	0,092
Con Factores	0,118	0,157	0,207		0,338	0,296	0,273	0,083	0,170	0,172	0,281	0,215
ATCC				0 dias			10 dias			20 dias		
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3		Abs 1	Abs 2	Abs 3	
OH Con Factores	0,238	0,220	0,127		0,214	0,307	0,356	0,133	0,150	0,125	0,190	0,179
VERO Sin Factores	0,242	0,270	0,209		0,276	0,314	0,327	0,126	0,160	0,182	0,096	0,106

Fosfatasa	Alcalina						
MO	HG SF	MO			No células		
DesStd	X nKt	DesStd	MO PL SF	SD	MO HG SF	SD	Días de Cultivo
0,0000001	0,00267685	0,002510633	1236	0,007	289	0,060	0
0,003779479	0,0001	0,000263238	813	0,010	227	0,135	10
0,00607507	0,0001	0,00069111	777	0,067	211	0,345	20
0,001858709	0,003280003	0,000131619	5947	0,432	1006	0,535	35
MO	HG CF	MO			No células		
DesStd	X nKt	DesStd	MO PL CF	SD	MO HG CF	SD	Días de Cultivo
0,0000001	0,0001	0,0000001	1155	0,128	180	0,041	0
0,015629179	0,024045697	0,002608292	682	0,075	614	0,183	10
0,012985167	0,008220113	0,004378603	694	0,602	189	0,073	20
0,0100097	0,017123799	0,002847349	2662	1,367	949	0,469	35
					No células		
SD	VERO	SD	ATCC	SD	VERO	SD	Días de Cultivo
0,00182	0,01264	0,00263	559	0,009	796	0,020	0
0,00621	0,01827	0,00228	541	0,008	143	0,001	10
0,04893	0,00538	0,00243	743	0,028	500	0,041	20
0,00086	0,00141	0,00141	449	0,027	787	0,042	35

	Actividad	Fosfatasa	Alcalina	Normalizada	
MO PL SF	SD 1	MO HG SF	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
0,0001	0,0000	0,0093	0,0015	0,00000	0,0017
0,0214	0,0036	0,0004	0,0036	0,00408	0,0040
0,0355	0,0041	0,0005	0,0024	0,00463	0,0027
0,0080	0,0080	0,0033	0,0007	0,00909	0,0008
MO PL CF	SD 1	MO HG CF	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
0,0001	0,0000	0,0006	0,0000	0,00000	0,0000
0,0487	0,0118	0,0392	0,0048	0,01335	0,0054
0,0488	0,0078	0,0435	0,0003	0,00884	0,0004
0,0125	0,0137	0,0180	0,0013	0,01549	0,0015
ATCC	SD 1	VERO	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
0,0096	0,0017	0,0064	0,0053	0,00192	0,0060
0,0158	0,0049	0,0513	0,0003	0,00553	0,0004
0,0218	0,0135	0,0043	0,0005	0,01523	0,0006
0,0092	0,0023	0,0007	0,0059	0,00263	0,0067

Actividad	Fosfatasa	Alcalina	Normalizada	
SD 1	MO HG SF	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
6,573E-10	0,0092729	0,0001501	7,438E-09	0,0016983
3,606E-05	0,0004397	3,553E-05	0,00408	0,0040203
0,0004095	0,000475	0,0002386	0,0046344	0,0027001
0,000803	0,003262	7,043E-05	0,0090862	0,000797
SD 1	MO HG CF	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
1,282E-08	0,0005556	4,133E-09	1,451E-07	4,676E-08
0,0011798	0,0391898	0,0004767	0,0133503	0,006394
0,0078162	0,0434942	0,0003189	0,0088447	0,0090732
0,0261582	0,0180447	0,0014091	0,0154889	0,0059066
SD 1	VERO	SD 2	Int Cof 1	Int Cof 2
1,695E-05	0,0063572	5,27E-05	0,0019181	0,0059631
4,884E-05	0,0512535	3,094E-06	0,009381	0,004593
0,0013461	0,0043016	9,891E-05	0,0076159	0,0066534
2,324E-05	0,0007184	5,922E-05	0,0026297	0,0067008