



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Odontología
División de Estudios de Posgrado e Investigación**

Laboratorio de Inmunoterapia Experimental

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS
ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA Y SU
DIFERENCIACIÓN OSTEoblástica *IN VITRO* SOBRE
UN ANDAMIO DE FIBRINA ACOPLADO A UN
PÉPTIDO MIMÉTICO DE LA COLÁGENA (GFOGER)**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

PRESENTA

KATIA JARQUÍN YÁÑEZ

TUTOR

Dr. Andrés E. Castell Rodríguez

ASESOR
Dr. Miguel Herrera Enríquez

México D.F.

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La utopía es como el horizonte

Está allá lejos

Y yo camino dos pasos:

El horizonte se aleja...

Y yo camino diez pasos

Y ella se aleja diez pasos...

¿Para qué sirve?

Sirve para eso. Para caminar.

Mario Benedetti

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y mi cariño:

A ti DIOS que me das la oportunidad de vivir y de regalarme una familia tan maravillosa que me acompaña y apoya en todo momento.

A mis padres que con su amor y ternura me han guiado y me han mostrado el camino a seguir, se que no siempre he hecho lo que me han indicado pero aún así, continúan confiando en mí y están a mi lado; sobre todo mi papá que desde el cielo ilumina mi sendero y de manera indirecta me hizo llegar hasta este lugar.

Mami gracias por estar conmigo, por tus sabios consejos, por tu paciencia y por ser mi impulso para seguir adelante, sin ti yo no sería nada.

A mis tíos Delfino Yáñez y Rafaela González por ser como mis segundos padres en este camino, por recibirme en su casa y hacerme crecer como persona y ayudarme ha descubrir cosas nuevas. Los quiero mucho y no tengo palabras para agradecerles, que Dios los llene de bendiciones por ser generosos, amorosos y comprensivos.

A Lizet, Marisela, Juan y Carolina por ser mis hermanos, por estar siempre cuando los necesito, por compartir mis sueños y ayudarme a lograrlos, por sonreír y llorar conmigo como cuando éramos niños.

A mis sobrinos: Naomy, Nazareth y Axel, por sus palabras de aliento y su gran inocencia, por ser la alegría de la casa y ver la vida tan sencilla (comer, jugar y dormir).

A Santa, Lalo, Cecy y Jazmín por compartir bellos momentos conmigo, jugar y reír a cada momento.

A Mario y Ana por ser mi guía y, el ejemplo a seguir. Por enseñarme que los sueños existen y se pueden alcanzar.

A Anaid, Mariana, Luis Mario, Nayeli, Zaira y Naila por contagiarme de su alegría.

A Narda por ser como mi hermana y amiga en todo este proceso, por apoyarme en mi trabajo y sacarme adelante en los momentos de desesperación, por hacerme reír en cada momento y buscarle la forma más adecuada a las cosas, por ser como eres, te quiero mucho y agradezco tu paciencia y generosidad.

A mi tío Luis, a mi prima Aide y a mi prima Martha por brindarme su apoyo y comprensión, por escucharme y darme un buen consejo.

A la Dra. Esther por hacer posible que haya iniciado esta maestría, por ser como mi mamá desde la licenciatura y aún continuar apoyándome, por sus palabras de aliento y creer en mí.

A las Dras. Claudia, Keila y Pilar por ser mi apoyo en la licenciatura y despertar en mí el interés por continuar estudiando.

A mis mejores amigas desde la licenciatura: Gris, Marce, Mary, Dolores, Ericka, Ari, Nancy y Jessy por compartir estos momentos conmigo y celebrar a cada momento cualquier acontecimiento, con el pretexto de reunirnos.

Al laboratorio de Inmunoterapia Experimental donde se encuentran mis amigos: Dany, Rodri, Rodri 2, Paty, Pau, Marlene, Judith, Dra Lupita, Maye, Nadia, Betty, Gaby (Gat), Jessy, Normita, Miguel y el Dr. Castell a los cuales les agradezco haberme recibido en este laboratorio y haber hecho posible concluir mi maestría, haber compartido las tristezas y alegrías por hacer de mi lugar de trabajo un lindo hogar.

Betty, Normita, Gat, Jessy y Rodri en especial les agradezco su comprensión y sus ánimos, por sonreír y llorar conmigo, por hacer de cada suceso algo bello y lindo de recordar, por ayudarme en todo momento a encontrar las mejores soluciones, por ser las personas más importantes en este camino y enseñarme que los problemas y dificultades son fáciles de resolver cuando se trabaja en equipo.

Al Dr. Miguel por ser participe en este trabajo, por escucharme y enseñarme que el trabajo es más simple cuando se hace con tiempo y por su apoyo incondicional.

Al Dr. Castell, por ser mi maestro y guía, por brindarme la oportunidad de crecer y aprender nuevos procedimientos durante estos dos años; por enseñarme a madurar y a enfrentar todo tipo de adversidad, por fomentar en mí la paciencia.

A todos por su COMPRENSIÓN, APOYO, CARIÑO y TIEMPO les dedico este trabajo que es la suma del esfuerzo continuo durante 2 años y el resultado del trabajo en equipo del laboratorio de Inmunoterapia.

INDICE

I.- AGRADECIMIENTOS	6
II.- ABREVIATURAS	7
III.- RESUMEN	8
IV.- INTRODUCCIÓN	
A. <u>Ingeniería de tejidos</u>	
Definición y generalidades	9
Aplicaciones	10
B. <u>Tejido óseo</u>	
Generalidades	12
Matriz ósea	13
Células del tejido óseo	15
Diferenciación osteoblástica	18
Osificación	20
C. <u>Médula ósea</u>	
Localización y definición	22
Células estromales de médula ósea	22
D. <u>Biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos</u>	24
Fibrina	26
E. <u>Moléculas de adhesión y matriz extracelular</u>	30
Integrinas	31
GFOGER	34
V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	37
VI.- OBJETIVOS	38
VII.- METODOLOGÍA	
Diseño experimental	39
Obtención y purificación de células	40
Proliferación celular	41
Preparación de muestras para citometría de flujo	41
Diferenciación y Calcificación de BMSCs sobre cajas de cultivo	42
Andamios de fibrina	44
Actividad celular	45
Diferenciación y Calcificación de BMSCs en andamios de fibrina	45
VIII.- ANALISIS ESTADISTICO	46
IX.- RESULTADOS	47
X.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	66
XI.- ANEXO	75
XII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

AGRADECIMIENTOS

Al comité revisor de esta tesis:

Dra. Patricia Tato Zaldivar
Dra. María Cristina Piña Barba
Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez
Dr. Luis Felipe Jiménez García
Dra. Argelia Almager Flores

Al laboratorio de Inmunoterapia Experimental del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM:

Por su tutoría y asesoría en la realización de este trabajo

Dr. Andrés Castell Rodríguez
M en C Miguel Herrera Enríquez

Por contribuir en mi formación y por su asesoría técnica y académica:

Biól. Beatriz Hernández Téllez
Biól. Exp. Jessica Miriam Medrano Hernández
M en C Gabriela Piñón Zárata
M en C Norma Cortés Lozano
Biól. Rodrigo Jiménez Sandoval
M en C Verónica Campos Ibarra

Por su apoyo en la realización de cortes y tinciones.

Técnica Académica Raquel Guerrero Alquicira ,

Por su apoyo en técnica de microscopía electrónica

M.C. Silvia Antuna Bizarro
Biól. Armando Zepeda Rodríguez

A la Facultad de Estomatología, UASLP:

Dra. María Esther Navarro Rincón Gallardo
Dra. Claudia Guevara Sánchez
Dra. María del Pilar Goldaracena Azuara
Dra. Keila Neri Alvarado Estrada
Dr. Francisco Cantú Gutierrez

Por su revisión y asesoría:

ME Lizet Jarquín Yáñez
Dra. Narda Angélica Yáñez González

ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
Ab	Antibiótico
ALP	Fosfatasa alcalina
BMPs	Proteínas morfogénicas de hueso
BMSC	Células estromales de médula ósea (por sus siglas en inglés)
BSP	Sialoproteína ósea
CD	Grupos de diferenciación (cluster of differentiaton)
CFUs-F	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos.
CFUs-M	Unidades formadoras de colonias de macrófagos
CTMO	Células totales de médula ósea
D	Días
DMEM	Medio mínimo esencial modificado por Dubelco
Dx	Dexometasona
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético.
GFOGER	Glicina, Fenilalanina, hidroxiprolina, glicina, ácido glutámico y arginina
IGF	Factor de crecimiento de insulina
IL	Interleucina
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MO	Médula ósea
MSC	Células madre mesenquimales
OCN	Osteocalcina
ODF	Factor diferenciador de osteoclastos
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PLGA	Ácido poliláctico glicólico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RANK	Receptor activador de NFκB
RANKL	Receptor activador del ligando NFκB
RGD	Arginina, Glicina y Aspartato.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA Y SU DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA *IN VITRO* SOBRE UN ANDAMIO DE FIBRINA ACOPLADO A UN PÉPTIDO MIMÉTICO DE LA COLÁGENA (GFOGER).

RESUMEN

La fibrina es un polímero de origen natural que se obtiene del plasma sanguíneo y que se ha utilizado ampliamente como andamio para distintos tipos de equivalentes tisulares construidos por ingeniería de tejidos en los que se ha observado una buena colonización por diferentes linajes celulares. En este sentido, es posible que dada su naturaleza estructural en forma de red y sus características biológicas se favorezca una buena adhesión y proliferación de células estromales de médula ósea para que se diferencien en osteoblastos. Además, un andamio de esta naturaleza dejaría los espacios necesarios para que las células diferenciadas produzcan proteínas de matriz extracelular permitiendo un arreglo tridimensional adecuado. Por otro lado, el empleo de proteínas miméticas de colágena, como el péptido GFOGER, no se ha explorado para inducir la diferenciación de células estromales de médula ósea en conjunto con una matriz de fibrina. **OBJETIVO:** Evaluar la formación de tejido óseo en un andamio de fibrina en presencia del péptido mimético de la colágena GFOGER sobre el que se han colocado células estromales de médula ósea (BMSCs). **MÉTODO:** Las BMSCs recién colectadas fueron sembradas en un andamio de fibrina con GFOGER a diferentes tiempos y condiciones de cultivo y se evaluó la viabilidad, morfología, proliferación y diferenciación celular mediante técnicas histológicas, microscopía electrónica de barrido, citometría de flujo y microanálisis de rayos X. **RESULTADOS:** La matriz de fibrina en conjunto con el péptido GFOGER permitió la adherencia y diferenciación adecuadas de las BMSCs a osteoblastos. Los resultados mostraron que tanto la proliferación celular como la diferenciación fueron significativas. **CONCLUSIONES:** El incremento en la proliferación celular y diferenciación de osteoblastos derivados de células estromales de médula ósea en presencia de una matriz de fibrina a la que se le adicionó el péptido GFOGER sugiere que se podría aplicar para la construcción de hueso artificial para una posible aplicación clínica.

Palabras clave: Ingeniería de tejidos, fibrina, GFOGER, BMSCs (Células estromales de médula ósea) y osteoblastos.

INTRODUCCIÓN

INGENIERIA DE TEJIDOS

DEFINICIÓN Y GENERALIDADES

La medicina regenerativa, es la disciplina médica que se fundamenta en los conocimientos disponibles sobre la biología celular, histología, inmunología y ciencias de los materiales entre otras, así como la capacidad de manipulación de las células madres y la capacidad de inducir su diferenciación en células de diferentes tejidos. Esta disciplina tiene como objetivo reparar o sustituir tejidos y órganos lesionados, sustentándose en la terapia celular y en la utilización de andamios de diversa composición que semejen las propiedades físicas, químicas o biológicas del tejido u órgano a sustituir (Guerra Cobian O *et al*, 2007). El término "Medicina regenerativa" fue acuñado en 1998 para describir el objetivo unificador de trasplante de células, la ingeniería de tejidos y la transferencia nuclear, es decir, la regeneración de los tejidos vivos y órganos (Kim KH, 2011).

Todas las células somáticas del organismo tienen el mismo contenido genético, no obstante, lo que distingue una estirpe celular de otra es la expresión diferencial de distintos genes; así, las células que expresan determinados genes, producen proteínas específicas. Lo que determina qué genes son expresados en una célula determinada, no es solo el contenido genético de la célula, sino también los factores externos al genoma, entre los que se hallan el microambiente en que vive la célula, que contiene gran cantidad y diversidad de señales que le indican y le ordenan cuál debe ser su patrón de comportamiento. Estas señales se denominan globalmente factores epigenéticos (que pueden ser factores externos a la célula o bien factores intracelulares que contienen las señales y patrones de diferenciación).

Una célula madre se caracteriza por dos condiciones: la capacidad de hacer copias exactas de sí misma de manera indefinida y la capacidad de diferenciarse en distintas estirpes celulares, tales como: músculo cardíaco, neuronas, hepatocitos, fibroblastos u odontoblastos etc.; la finalidad de la ingeniería de tejidos es elaborar equivalentes tisulares que involucren células, andamios y factores de diferenciación y crecimiento que le permita a las células tener el arreglo tridimensional y las condiciones semejantes a las del tejido que se suplirá (Guerra Cobian O *et al*, 2007).

De manera inicial, las células madre mesenquimales se obtuvieron de la médula ósea, pero en la actualidad también se obtienen de cordón umbilical, tejido adiposo, glándulas salivales, pulpa dental tanto de dientes deciduales como permanentes, del ligamento periodontal y del intestino (Guerra Cobian O *et al*, 2007; Lindner U *et al*, 2010).

APLICACIONES DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

En Boston, en 1954, Hartwell Harrison, jefe de urología de la Universidad de Harvard, mediante cultivo celular, obtuvo un riñón y realizó el trasplante de órganos humanos por primera vez. El concepto de trasplante de células cultivadas después del trasplante renal, dio lugar al primer trasplante de células humanas de médula ósea en la década de 1970. En ese momento, los investigadores combinaron los campos científicos de la ciencia de dispositivos y materiales con la biología celular siendo con esto los pioneros en un nuevo campo llamado "ingeniería de tejidos". El primer uso de la "ingeniería de tejidos", se acuñó cuando se hizo referencia al tejido de la córnea en 1985. Después con el descubrimiento de células madre embrionarias de ratón en la década de 1980 dio un gran impulso para el campo de células madre y llevó a la descripción de células madre embrionarias humanas en 1998 y a la creación del primer mamífero clonado, una oveja llamada Dolly, anunciado en 1997 (Kim KH, 2011).

El aislamiento de las células estromales de médula ósea para su aplicación en ingeniería de tejidos se realiza utilizando la gran capacidad de adherencia de estas células al plástico de las cajas de cultivo y por la valoración de criterios morfológicos tales como fenotipo parecido a fibroblastos; con este procedimiento se ha obtenido una población heterogénea compuesta por células madre mesenquimales y células progenitoras con diferentes linajes ya comprometidos hacia osteoblastos, adipocitos y/o condroblastos (Lindner U *et al*, 2010).

La ingeniería de tejidos para la reconstrucción de la uretra puede implicar matrices solas, basándose en la capacidad natural del cuerpo para volver a regenerarse, utilizadas para orientar o dirigir el crecimiento de nuevo tejido, o bien el uso de matrices con células. Las matrices de colágena acelular que se derivan de la submucosa de vejiga de los donantes, se han utilizado tanto a nivel experimental y clínico para el reemplazo de la uretra. La uretra con éxito se regenera, pero aún es un procedimiento limitado (Kim KH, 2011).

La ingeniería de tejido óseo es una fuente particular para el tratamiento de defectos óseos derivados de enfermedades asociadas a daño en hueso y reparación de fracturas. Tradicionalmente, estos defectos son tratados por trasplantes de hueso del propio paciente; aunque esto evita las complicaciones de rechazo inmunológico, es frecuente la dificultad de obtener suficiente hueso del donador. Debido a ello varios grupos de investigación se han enfocado en la expansión de células óseas del paciente en cultivos, seguido del trasplante de las células óseas dentro de un andamio adecuado en el sitio del defecto óseo.

En diversos estudios se ha evaluado el efecto de la liberación de factores de crecimiento, para inducir diferenciación celular, como el IGF-I y TGF- β 1 a partir de nanopartículas en células mesenquimales de la médula ósea en andamios de PLGA, en el cual encontraron que hubo un incremento significativo en la proliferación y diferenciación hacia células del cartílago (Ertan AB *et al*, 2011); también se usan vidrios bioactivos mesoporosos que son materiales usados en la regeneración del tejido óseo a causa de su extraordinaria formación de hidroxiapatita *in vitro* (Yun HS *et al* 2011).

Es bien sabido que el diseño de los poros es una determinante importante de la cantidad y la distribución de hueso regenerado en los andamios del tejido óseo artificial. Una característica indispensable es que los andamios deben contener las interconexiones de los poros del orden de 100-1000 μ m (denominado macroporosidad). Dentro de este rango, no hay un tamaño óptimo de la medida de la interconexión. Estudios recientes sugieren que las interconexiones de poros que impregnan al material de soporte se basan en el orden de 2-20 micras (denominadas microporosidad), como se sabe el crecimiento del hueso en el espacio de macroporos se da a un ritmo más rápido y también proporcionar un nuevo espacio para el crecimiento óseo, sin embargo los efectos de las características microestructurales sobre el crecimiento óseo aún no se ha comprendido plenamente (Hoelzle DJ *et al*, 2011).

TEJIDO ÓSEO

GENERALIDADES

El tejido óseo es un tejido altamente dinámico en constante formación y resorción. Este proceso homeostático, denominado proceso de remodelación ósea, permite la renovación de un 5-15% del hueso total al año en condiciones normales. El remodelado óseo consiste: por un lado, en la resorción de una cantidad determinada de hueso llevada a cabo por los osteoclastos, y por el otro, la sustitución del tejido degradado mediante la formación de nueva matriz orgánica por los osteoblastos y su posterior mineralización. Este proceso tiene lugar en pequeñas áreas del hueso cortical y trabecular, llamadas “unidades básicas de remodelado óseo”(Fernández I *et al*, 2006). La característica que distingue al tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos (tejido cartilaginoso y adiposo) es la mineralización de su matriz, la cual le permite poseer las funciones de: sostén, protección, regulación homeostática de la calcemia (concentración de calcio en la sangre), función metabólica central ya que almacena calcio (Ca) principalmente pero además magnesio (Mg), fósforo (P), sodio (Na) y otros iones (Sobotta, 2009; Ross *et al*, 2007).

Desde el punto de vista histológico, el tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado que se mineraliza y que está altamente vascularizado e innervado, constituido por osteoblastos que secretan una matriz orgánica rica en colágena tipo I y abundantes glucoproteínas que permiten el depósito de fosfato de calcio, en forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), formando láminas de matriz ósea calcificada. La disposición de estas laminillas es lo que determina que el hueso sea compacto o esponjoso. Ambos tipos de hueso están formados por unidades estructurales denominadas osteonas trabeculares o corticales. En el hueso cortical, también llamado compacto, las células osteoprogenitoras se localizan alrededor de vasos sanguíneos. Estas células comienzan a proliferar en oleadas sucesivas formando láminas celulares de disposición concéntrica. Estas células postmitóticas que van situándose en la periferia se diferencian a osteoblastos y comienzan a alejarse unas de otras por la síntesis y secreción de proteínas de matriz extracelular, que una vez calcificada forman la osteona cortical. Los vasos sanguíneos alrededor de los cuales se formaron las osteonas finalmente resultan incluidos en un conducto al que se denominada de Havers. Una vez que los

osteoblastos dejan de sintetizar matriz orgánica ósea y esta se calcifica, se les llama osteocitos. Los osteocitos se comunican unos con otros a través de prolongaciones citoplásmicas incluidas en la matriz calcificada. El conductillo en el que están incluidas las prolongaciones de los osteocitos se llaman canalículos óseos. El hueso esponjoso, también llamado trabecular, lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra la médula ósea. Las trabéculas del hueso esponjoso se disponen y orientan a lo largo de las líneas de tensión que soporta cada porción del hueso. Esta orientación permite al hueso una mayor resistencia a las presiones o a las tracciones (Fernández *et al*, 2006; Sobotta, 2009; Ross, *et al*, 2007; Pró, 2012).

MATRIZ ÓSEA

El tejido óseo se caracteriza principalmente por tener una matriz que posee componente orgánico e inorgánico. En comparación con el cartílago, el hueso tiene solo un 25% de agua en la matriz, mientras que la matriz cartilaginosa contiene un 75% (Pró, 2012).

La matriz ósea está compuesta de la siguiente manera:

- 35% de material orgánico
- 65% por sales inorgánicas

Matriz orgánica

Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca la colágena.

Colágena: El 90% de la matriz extracelular está constituido por colágena, sobre todo tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágena tipo III, relacionada con las fibras de Sharpey y de colágena tipo XII. Una molécula de colágena individual está formada por tres cadenas polipéptidas llamadas cadena α . Las cadenas α se enroscan entre sí para formar una triple hélice dextrógira. Cada tercer aminoácido de la cadena es una glicina, excepto en los extremos de la cadena α . Una hidroxiprolina o una hidroxilisina con frecuencia preceden a cada glicina de la cadena y cada glicina de la cadena suele ser seguida por una prolina. La prolina, la hidroxiprolina y la glicina son indispensable para la conformación en hélice triple de la colágena. Las fibras de colágena se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre los aminoácidos.

Proteoglucanos: Constituyen el 10% de la matriz orgánica. Son glucosaminoglucanos (Hialuronato y condroitin sulfato, que intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea) unidos a una pequeña proteína donde lo que predomina en la molécula es el carbohidrato. El biglicano y la decorina son moléculas más pequeñas, que aparecen en las fases siguientes de la remodelación ósea y contribuyen a que el tejido óseo ofrezca resistencia a la compresión.

Proteínas con ácido gamma-carboxi-glutámico: Se pueden encontrar en varios tejidos, particularmente en cuatro proteínas que participan en la coagulación de la sangre incluyendo la protrombina, en proteínas renales, en proteínas óseas y en proteínas presente en varias calcificaciones ectópicas. El carboxiglutámico resulta fundamental para las proteínas de la coagulación, su presencia confiere a las proteínas, propiedades que permiten la unión a metales y esta condición es esencial para la interacción de estas proteínas con las membranas. En presencia de cantidad suficiente de calcio, las proteínas que poseen un grupo carboxiglutámico sufren una transformación estructural que expone un lugar de unión a fosfolípidos y por lo tanto a las membranas.

Entre éstas proteínas, en el tejido óseo se encuentran la osteocalcina (OCN).

La osteocalcina es una proteína pequeña de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de la vitamina D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene restos de ácido gamma-carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos. La osteocalcina captura el calcio desde la circulación y atrae y estimula a los osteoclastos en el remodelado óseo.

Glucoproteínas óseas: Actúan en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la sustancia fundamental mineralizada. Algunas de las glucoproteínas más importantes son la osteonectina y sialoproteínas como la osteopontina (que media la adhesión de las células a la matriz ósea).

La osteonectina es una glucoproteína con afinidad por la colágena tipo I, que interviene en la regulación de la adhesión celular con la matriz extracelular.

Proteínas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glucoproteínas fundamentales en el proceso de remodelado y regeneración ósea. También actúan permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales intracelulares.

Factores de crecimiento y citocinas: Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.) que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina. Entre estas moléculas encontramos al factor de crecimiento parecido a insulina IGF-I y II (Insulin-like growth factor I y II), factor de crecimiento transformante TGF- β (Transforming growth factor- beta) y factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (Platelet derived growth factor), la proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y las interleucinas (IL-1, IL-6) (Ross *et al*, 2007; Sobotta, 2009).

Matriz inorgánica

El componente mineral del hueso representa el 65% de su peso. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ y, en menor proporción, por magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor (Pró, 2012).

CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO

Osteoblastos

Son células grandes (20-30micrometros), que se reconocen en el microscopio óptico por su forma poliédrica y su distribución monoestratificada en la superficie donde se está formando tejido óseo. Poseen citoplasma basófilo, un aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso abundante. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz extracelular quedando ancladas a su matriz gracias a la participación de distintas integrinas y se comunican con los osteocitos y con otros osteoblastos vecinos, mediante uniones comunicantes ricas en conexina 43, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citocinas y prostaglandinas. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide (sustancia no mineralizada) a un ritmo de 2 a

3 micrómetros por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 micrometros por día.

Funciones:

1. Sintetizan las proteínas colágenas y proteínas no colágenas de la matriz orgánica del hueso.
2. Dirigen la disposición de las fibras de colagena de la matriz extracelular.
3. Contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfasa alcalina.
4. Inducen la activación de los osteoclastos a través de la síntesis de citocinas específicas.
5. Sintetizan factores de crecimiento.

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, o, a través de la modulación funcional, quedar atrapados como osteocitos en su matriz mineralizada (Fernández *et al*, 2006).

Células de revestimiento óseo

Las células limitantes o de revestimiento óseo son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso y orgánulos escasos. Sus funciones son: diferenciarse en osteoblastos para la construcción de nuevo tejido óseo además de intervenir en el mantenimiento y la nutrición de los osteocitos incluidos en la matriz ósea subyacente, regular el movimiento del calcio y fosfato desde la sangre hacia el hueso.

Osteocitos

Una vez mineralizada la matriz, los osteoblastos quedan atrapados dentro de la matriz ósea, terminando su proceso de diferenciación transformándose en osteocitos. Estas células tienen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de cavidades llamadas lagunas u osteoplasmas, cuentan con numerosos procesos citoplasmáticos que se localizan en el interior de los canalículos óseos también llamados conductos calcóforos que están llenos de líquido extracelular. Los osteocitos se organizan formando un sincisio funcional.

Los osteocitos constituyen el estadio final de diferenciación de la línea osteoblástica y estas células son incapaces de proliferar. Poseen un fenotipo similar al de los osteoblastos, pero además se puede detectar como marcador específico a la molécula CD44, que es una proteína de membrana que se une a ácido hialurónico, osteopontina, colágena y a metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Fernández *et al*, 2006; Ross, *et al* 2007; Sobotta, 2009).

Osteoclastos.

Los osteoclastos son células encargadas de la resorción ósea. Son células grandes (100 micrómetros), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) que pesa 35kDa y contiene hierro, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto in vivo como in vitro.

Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Macrófagos” (CFU-M), precursoras de macrófagos.

Los osteoclastos son regulados por citocinas y hormonas tales como: IL-1, IL-6, IL-11, LIF y hormona paratiroidea (Heinemann *C et al*, 2011), además cuentan con receptores para calcitonina, que modula negativamente la generación de pseudópodos (Ross *et al*, 2007).

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en su membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la resorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a resorber y se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el borde en cepillo sellando los límites del área mediante la participación de integrinas. La integrina del osteoclasto, particularmente $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, reconoce la secuencia Arg- Gly-Asp (RGD) existente en la colágena y otras proteínas de la matriz ósea facilitando la unión de la célula a la colágena. En la zona de resorción el pH es ácido, ya que el osteoclasto libera grandes cantidades de hidrógeno (H^+) generado por la anhidrasa carbónica tipo II al mismo tiempo que libera iones cloro gracias a proteínas intercambiadoras, conjugándose en el líquido extracelular para formar ácido clorhídrico. Los osteoclastos también secretan distintas enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K y glucoronidasas, que inducen la resorción del hueso mediante la solubilización de la matriz

orgánica primero y de la mineral después (Fernández I *et al*, 2006; Ross *et al*, 2007; Sobotta, 2009).

Con respecto a la osteoclastogénesis se conoce que los osteoblastos son fundamentales para la formación de los osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3 moléculas clave: OPG (osteoprotegerina, sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (ligando del receptor activador de NFκB, situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (receptor activador de NFκB, situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). El RANKL antiguamente llamado factor de diferenciación de osteoclastos ODF (osteoclast differentiation factor), es una citocina transmembranal perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La interacción entre RANKL y su receptor RANK producen una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la resorción ósea. Asimismo, los efectos de RANKL tanto *in vivo*, como *in vitro* son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la familia de los receptores TNF (Kartsogiannis V *et al*, 1999).

DIFERENCIACIÓN OSTEABLÁSTICA:

La diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: *Ihh* (Indian hedgehog) y *Shh* (Sonic hedgehog). También es esencial el factor de transcripción *Cbfa 1* (core-binding factor a-1, también llamado *Runx2*) (Fernández I *et al*, 2006). Este último induce y regula la expresión de proteínas de la matriz ósea como *Osterix*, el cual es un factor de transcripción indispensable para la diferenciación osteoblástica e indicador de osteogénesis. Se ha sugerido que los factores de transcripción relacionados con *Runx2* y con *Osterix* cumplen funciones de activación y de regulación de los marcadores osteogénicos, tanto en conjunto como de forma individual (Díaz L. M *et al*, 2007).

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica (Fernández I *et al*, 2006). La señalización de BMP es iniciada por la unión de BMP extracelular a sus receptores de BMP (BMPR), resultando en BMPR tipo II mediado por la activación de BMPR tipo I el cual causa la fosforilación y activación de molécula de señalización intracelular Smad. Diversos estudios sobre estas señalizaciones sugieren que señales específicas a través del receptor BMPR tipo IA tienen un importante efecto sobre el proceso de esqueletogénesis. La BMPR-IA es la responsable de la iniciación osteogénica (Wang A *et al*, 2010).

A medida que las células precursoras se diferencian expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. Entre estas proteínas de diferenciación se encuentran la colágena I, la osteopontina, la fosfatasa alcalina, la sialoproteína ósea y la osteocalcina.

La colágena I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras.

La osteopontina, es una glucoproteína hidrofílica, fosforilada de aproximadamente 314 aminoácidos. Su peso molecular oscila entre 41 y 75 kDa debido a diferentes modificaciones postranscripcionales, secretada a la matriz extracelular por los osteoblastos durante la formación del tejido óseo y está relacionada con la adherencia celular, la calcificación y con la resorción del hueso (Beck G *et al* 2000). La OPN puede unirse a un gran número de receptores, incluyendo a las integrinas $\alpha_v(\beta_1 \beta_3 \text{ ó } \beta_5)$ y $(\alpha_4 \alpha_5 \alpha_8 \text{ y } \alpha_9) \beta_1$. Estos receptores, directa o indirectamente activan vías de señalización celular permitiendo a la OPN mediar interacciones célula-célula y célula-matriz (Oldberg A *et al*, 1986; Smith JH *et al*, 1987; Patarca R *et al*, 1989; Denhardt DT, 1993; O'Regan AW *et al* 2000; Denhardt DT *et al* 2001).

En estudios anteriores se ha establecido que la molécula Osterix regula la expresión de osteopontina sin embargo, también se sabe que la presencia de fosfato inorgánico desencadena una cascada que induce la expresión de osteopontina y que en ratones "knockout" para Osterix, se encuentra la expresión de osteopontina en las células mesenquimales (Díaz L. M. *et al* 2007).

La fosfatasa alcalina (ALP) es una metaloenzima homodimérica. Sus subunidades tienen una masa molecular de 50kDa y contiene dos iones de Zn (zinc) y uno de Mg (magnesio) (Sekiguchi S et al 2011) que favorecen el depósito de calcio en la matriz extracelular. La fosfatasa alcalina es una enzima de membrana plasmática (ectoenzima) que hidroliza ésteres de monofosfato a un pH alto, además participa en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. Esta enzima desaparece cuando las células suspenden la síntesis proteica y quedan incluidas dentro de la matriz ósea. La fosfatasa alcalina es un marcador ampliamente utilizado en cultivos celulares para identificar a osteoblastos (Fernández I *et al*, 2006; Dengshun M *et al*, 2002; Wang A *et al*, 2010).

La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación de pre-osteoblastos a osteoblastos y se expresan cuando se inicia la mineralización de la matriz orgánica ósea. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación (Fernández I *et al*, 2006).

La osteocalcina, está implicada en el control de la mineralización de la matriz ósea y se expresa exclusivamente en la línea osteoprogenitora.

Por otro lado, es de notar que el contacto entre célula-célula por sí sólo induce la expresión de osteocalcina en osteoblastos. En contraste, se ha demostrado que la adición de dexametasona (10^{-8} M) en cultivos de células de médula ósea inhibió la expresión de osteocalcina en células diferenciadas a osteoblastos. Es de notar que la inhibición de la expresión de osteocalcina fue en ausencia de 1,25 dihidroxi-vitamina D3 en medios de cultivo de células de médula ósea (Wang A *et al*, 2010).

OSIFICACIÓN

Los huesos son formados por los osteoblastos y osteocitos que producen la matriz ósea. Hay diferentes mecanismos a partir de los cuales se desarrollan los distintos huesos. Estos tipos de osificación se diferencian por el tejido a partir del cual se desarrolla el hueso.

Osificación intramembranosa

En la osificación intramembranosa o directa, el tejido óseo surge a partir de células mesenquimales características, que se concentran en los llamados centros de osificación provistos de abundantes vasos sanguíneos y allí se diferencian continuamente en osteoblastos. Los osteoblastos que se agrupan formando asociaciones aplanadas, comienzan a producir la matriz que aún no tiene depósito de calcio, llamada sustancia osteoide, que contiene sobre todo proteoglucanos, glucoproteínas y colágena tipo I, para que a continuación en la matriz se de el depósito de fosfato de calcio en forma de hidroxapatita.

Este tipo de osificación se produce en los huesos planos que rodean la cavidad craneal, en la mandíbula y la clavícula.

Osificación endocondral

En la osificación endocondral, el molde inicial del hueso es de tejido cartilaginoso. El cartílago hialino es sustituido progresivamente por el tejido óseo. Por este mecanismo surgen la mayor parte de los huesos del cuerpo. Después de la formación de una pieza esquelética del cartílago la osificación condral ocurre en dos pasos:

- 1.- Osificación pericondral.
- 2.- Osificación endocondral.

Osificación pericondral: Se caracteriza por la formación de un manguito alrededor del centro de la diáfisis cartilaginosa de la pieza esquelética. Las células del tejido cartilaginoso rodeado por el manguito sufren hipertrofia e impulsan la calcificación de la matriz a su alrededor y mueren. Luego los vasos sanguíneos penetran el cartílago hipertrófico calcificado con lo cual se inicia el proceso de osificación endocondral.

Osificación endocondral: Hay una penetración de vasos sanguíneos y junto con ellos migran células degradadoras de cartílago (condrocitos), y crean cavidades que luego son ocupadas por vasos sanguíneos y mesénquima. Entre las células del mesénquima invasor hay células osteoprogenitoras que se diferencian en osteoblastos que forman hueso alrededor de los vasos sanguíneos (Ross *et al*, 2007; Sobotta, 2009;Pró , 2012).

MEDULA ÓSEA

La médula ósea es un complejo celular que incluye a precursores hematopoyéticos y a su progenie diferenciada junto con tejido conjuntivo estromal. El estroma, por sí mismo, es una población heterogénea de células que incluyen adipocitos, reticulocitos, células endoteliales, células óseas diferenciadas y fibroblastos que están en contacto directo con elementos hematopoyéticos. Se ha establecido que el estroma colabora en la creación de un microambiente adecuado para la diferenciación de las células madre hematopoyéticas (Georgen F *et al*, 1997; Jaiswal N *et al*, 1997; Seok-Jung K *et al*, 2008; Lindner U *et al*, 2010).

CELULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA (BMSCs)

La presencia de células adherentes como fibroblastos en aspirados de médula ósea fue reportado por primera vez por Friedenstein *et al* (1970) quienes las denominaron como pertenecientes a unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFUs-F). Las CFUs-F poseen un alto potencial proliferativo y de diferenciación, a partir de ellas se puede formar hueso. Es necesario señalar que no todas las CFUs-F pueden ser consideradas como células progenitoras de células madre osteoprogenitoras, sin embargo solo poseen la capacidad de diferenciarse a varios tejidos mesenquimales (Friedenstein AJ *et al* 1970; 1990; Pittenger M *et al*, 1999; S Keila *et al*, 2001; Derubeis Anna R *et al*, 2004; Sengers B *et al*, 2010; Kagami H *et al*, 2011).

A pesar de que las células adherentes de médula ósea han sido utilizadas para ingeniería tisular de tejido óseo, la población es heterogénea y solamente un número limitado de células (células progenitoras) pueden formar colonias osteogénicas secundarias (Q, QU, M *et al*, 1998; Kagami H *et al*, 2011)

La Sociedad Internacional de Terapia Celular ha sugerido denominarlas “Células estromales mesenquimales multipotentes” Kagami H *et al*(2011). Además, las células madre de médula ósea pueden también ser llamadas células estromales multipotentes derivadas de médula ósea (MSCs)por sugerencia de Horwitz *et al* (2005) y Kagami H *et al* (2011).

La misma sociedad ha provisto un criterio mínimo para definir a las MSCs las cuales deben ser positivas para CD105, CD73 y CD90 y negativas para CD34, CD45, CD11a, CD19 y HLA-DR. Sin

embargo, estos marcadores no son suficientes para definir a una población de células madre osteoprogenitoras. Un estudio reciente de Kagami H y cols (2011) demostró que las células podrían ser MCAM/CD146+, y se han propuesto otros marcadores como: a CD271, el antígeno 1 de células madre mesenquimales (MSCA-1), CD56, SSEA-4, STRO-1 y el factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGF-RB; CD140b) (Lindner U *et al*, 2010).

La nomenclatura de estas células no es del todo clara ya que las células han sido llamadas CFUs-F y MSC pero también se les ha llamado células estromales de médula ósea y células estromales mesenquimales, aún más no todas las células son multipotentes y los cultivos contienen células con distintos grados de diferenciación. Por ello, es que se les ha llamado “Células estromales de médula ósea (BMSCs) (Pittenger M *et al*, 1999; Sengers B *et al*, 2010).

Las BMSC conforman una población heterogénea, por lo que es difícil definir el origen de todas las células que constituyen esa población, aunque se considera que el porcentaje de células madre en BMSCs en toda la médula ósea es menor al 0.01%. Las BMSCs son frecuentemente empleadas como fuente celular para procedimientos de ingeniería de tejidos (Kagami H *et al*, 2011).

BIOMATERIALES UTILIZADOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Los biomateriales son materiales o estructuras de origen natural o sintéticos elaborados por el hombre cuyas funciones fisicoquímicas, mecánica y/o biológicas, asemejen a las propiedades de los tejidos sanos con la finalidad de que puedan suplir o reemplazar las funciones de los tejidos dañados. Estos biomateriales pueden ser considerados biocompatibles cuando estos materiales no provocan una respuesta inmunológica o si se induce es mínima (Chen E *et al*, 1980).

La compatibilidad es estrictamente la cualidad de interacción armoniosa. “Biocompatibilidad” sugiere que el material utilizado muestre un comportamiento armonioso al estar en contacto con el tejido o los fluidos del cuerpo.

Los biomateriales muestran un desempeño biológico, que es la interacción entre el material y el sistema vivo (Chen E *et al*, 1980). Los dos aspectos de este desempeño son:

1. Respuesta del huésped: la respuesta local o sistémica, la respuesta terapéutica del sistema vivo sobre el material.
2. Respuesta del material: la respuesta del material sobre el sistema vivo.

Usualmente definimos a los andamios de tejidos como estructuras y materiales biológicos modificados, como colágena o hueso sin células; mientras que los materiales miméticos pueden consistir en polímeros sintéticos, metales o cerámicas con superficies o fibras modificadas de material biocompatible y disponible para implantes de tejidos o ingeniería de tejidos. Debido a ello numerosos compuestos han sido desarrollados y consisten en componentes biológicos orgánicos o inorgánicos. Estos sustitutos en el tejido óseo actúan sobre el hueso huésped por medio de distintos mecanismos: osteoconducción, osteoinducción y/o estimulando la osteogénesis. La osteoconducción permite el crecimiento óseo por aposición, a partir del hueso existente y por encima del mismo. Por consiguiente, se necesita para dicho proceso la presencia de hueso o de células mesenquimatosas diferenciadas en el sitio de lesión. Un biomaterial osteoinductivo es capaz de estimular la transformación de células indiferenciadas en osteoblastos o condroblastos en una zona en la que no cabe esperar dicho comportamiento. Los materiales osteoinductivos más utilizados en implantología son los aloinjertos óseos. Se

obtienen a partir de cadáveres, y se procesan y almacenan en diferentes formas y tamaños en bancos de hueso para ser aplicados en el futuro (Turanza J et al, 2000; Anitua E et al, 2010).

El propósito de diseñar materiales biomiméticos como hueso o implantes dentales, stents vasculares, tejido cardíaco, tejido de vejiga o tejido nervioso no consiste solamente en reproducir las propiedades miméticas biomecánicas del tejido del huésped, sino también generar andamios tridimensionales que soporten las funciones esenciales de la célula incluyendo: adhesión, crecimiento, proliferación, diferenciación y la expresión de genes específicos del tejido, evitando reacciones tóxicas y respuestas inmunes adversas.

Las características demandadas en los biomateriales en ingeniería de tejidos incluyen susceptibilidad a la invasión vascular y en algunos casos la biodegradación y el reemplazo del biomaterial por matriz extracelular generada por el propio huésped.

El andamio ideal para ingeniería de tejidos y regeneración es aquel que asemeja las propiedades biomecánicas del tejido blanco y sirve como hospedero para las células tanto endógenas como implantadas. Además como soporte para adhesión celular y para el crecimiento, migración, diferenciación y estabilidad del fenotipo. No debe provocar respuestas inmune ni reacciones tóxicas, biodegradable, con excepción de aquellos biomateriales en los cuales se requiere de su integridad para cumplir su función (implantes dentales y stents vasculares entre otros). Para este propósito se han generado una amplia variedad de andamios porosos, sintéticos o biopolímeros de excelente biocompatibilidad y propiedades biomecánicas para asegurar su reproducibilidad, eficiencia y persistencia en la regeneración de tejidos.

Algunos andamios diseñados para ingeniería de tejidos de hueso y para la regeneración tisular guiada en cavidad oral solían ser compactos, hechos de metal, cerámica, vidrio o polímeros orgánicos, sin embargo la integración del andamio y su biocompatibilidad se alcanza de manera mas eficiente cuando se realizan modificaciones de la superficie como: superficies ásperas, tratamiento ácido para grabar el material o cubrirlas con proteínas adhesivas. En contraste con los bloques de implante sólidos, los andamios porosos ofrecen la gran ventaja de permitir el infiltrado celular y la vascularización, bajo peso y proveen propiedades biomecánicas.

Por décadas numerosas y extensas investigaciones sobre de la estructura e influencia biológica de la MEC (matriz extecelular) sobre el comportamiento celular y destino celular ha

mostrado que tres tipos de información de la MEC son relevantes para diseñar superficies biomiméticas:

1. Propiedades físicas, elasticidad, dureza.
2. Señales químicas específicas de epítopes de péptidos que contienen un amplia variedad de moléculas de matriz extracelular.
3. La topografía de sitios adhesivos del microambiente en la nanoescala.

La estrategia de diseñar materiales que reemplazan tejidos duros (hueso y dientes), emplea metales y cerámicas ya que son persistentes y estables, su superficie permite la adhesión, son compatibles y actúan como soporte para las células. Ahora se aprecia que no solo es la interacción de la superficie con la célula, sino que también la elasticidad y rigidez local del biomaterial contribuye significativamente en el comportamiento y diferenciación celular (Barczyk M *et al* 2009; Klaus von der M *et al* 2010).

Nuevas expectativas de los biomateriales:

1. Los biomateriales están siendo diseñados para que permitan la incorporación y liberación de moléculas bioactivas tales como nanopartículas que contienen factores de crecimiento o citocinas
2. Biomateriales cubiertos con macromoléculas adhesivas de la MEC o péptidos de unión celular derivados de estas moléculas que activan a integrinas u otros receptores celulares.
3. Superficies biomiméticas que son dotadas con modelos definidos de nanoescalas diseñados para inducir respuestas específicas en las células aún en ausencia de proteínas bioactivas o péptidos.

FIBRINA

La fibrina es un polímero de origen natural que se obtiene del plasma sanguíneo.

El plasma es el material extracelular líquido de la sangre, su volumen relativo es de 55%. Más del 90% del peso del plasma corresponde al agua que sirve como solvente para una gran variedad de solutos que representan del 1 al 2%:

- Electrolitos (Na, K, Ca, Mg, Cl, HCO₃, PO₄, SO₄).
- Sustancias nitrogenadas no proteínas (urea, ácido úrico, creatina, sales de amonio).
- Sustancias nutritivas (glucosa, lípidos, aminoácidos).

- Gases sanguíneos (oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno).
- Sustancias reguladoras (hormonas, enzimas).

Además el plasma contiene proteínas que representan del 7 al 8% como:

1. La albúmina se sintetiza en el hígado, mantiene la presión coloidosmótica también actúa como proteína transportadora porque fija y transporta hormonas (tiroxina) metabolitos(bilirrubina) y fármaco (barbituratos).

2. La globulina es secretada en el hígado y las inmunoglobulinas son secretadas por las células plasmáticas para formar anticuerpos.

3. El fibrinógeno se sintetiza en el hígado. En una serie de reacciones en cascada, junto con otros factores de la coagulación, el fibrinógeno se transforma en fibrina.

La fibrina es un biopolímero de monómeros de fibrinógeno. La molécula de fibrinógeno están compuestas de 2 juegos de 3 cadenas de polipéptidos nombrados Aa, Bb y g, las cuales son unidas por 6 puentes de disulfuro. El factor XIIIa de coagulación de la sangre es una trasglutaminasa que rápidamente se une a la cadena gamma de la fibrina polimérica por introducción intermolecular (g- glutamil) de enlaces covalentes entre lisina de la cadena gamma y la glutamina de las otras cadenas. Esta unión produce una red estable de fibrina que resiste a la degradación de proteasas (Llames S et al, 2004; Eyrich D et al, 2007). Cuando la fibrina y la trombina son mezcladas, la trombina, en presencia de calcio, convierte el fibrinógeno a fibrina. El polímero de fibrina está formado por estructuras estables que facilitan la polimerización de la colágena producida por los fibroblastos. La adición del factor XIII, factor estabilizador de fibrina presente en la sangre, podría proteger el coágulo del polímero de fibrina de la fibrinólisis prematura. La plasmina y otras enzimas proteolíticas degradan fibrina y fibrinógeno en pequeños polipéptidos fragmentados llamados productos de degradación de la fibrina estos productos inhiben la formación de fibrina por inhibición competitiva de la acción de la trombina así como la inhibición por polimerización de los monómeros de fibrina directamente. Las bacterias producen enzimas proteolíticas las cuales incrementan la tasa de despolimerización de fibrina (Lachlan J *et al* 2001).

La fibrina fue originalmente estudiada por su efecto hemostático en heridas por Bergel (1909) y fue después usada por Gray, quien aplicó fibrinógeno para hemorragia cerebral. En

1940, Young and Medawar usaron la fibrina como un pegamento para reparar nervios periféricos y 4 años más tarde el uso de fibrina para injerto de piel fue reportado por Tidrick y Warner. Inicialmente fue remojar el injerto dentro de plasma; antes de colocarlo sobre la herida, el cual había sido cubierto con solución de trombina. En 1972, Mahas, *et al.* introdujera comercialmente pegamento de fibrina con una concentración alta de fibrina (Lachlan J *et al*, 2001)

Productos comerciales disponibles de adhesivo de fibrina

NOMBRE COMERCIAL	FABRICANTE	COMONENTES	PAIS DE LICENCIA	LICENCIA DE USO
Beriplast	Centeon, Marburg, Alemania	Fibrinógeno, Factor XIII, Aprotinina (bovino), trombina y cloruro de calcio	Austria Alemania	Hemorragias, heridas, sangrado quirúrgico.
Biocol	Bio-transfusion, Lille, Francia	Fibrinógeno, Fibronectina, Factor XIII, Aprotinina (bovino), trombina y cloruro de calcio	Francia	Hemorragias
Haemocompletan	Centeon	Fibrinógeno	Austria, Suiza, Alemania	Desordenes hemorrágicos
TachoComb	Nycomed, Pharma Roskilde, Dinamarca	Colágena, fibrinógeno, trombina, Apronina (bovino)	Austria, Alemania	Hemorragias
Tisseel Tissel VH (USA)	Baxter Hyland Immuno Glendale, California	Fibrinógeno, Fibronectina, Factor XIII, Plasminógeno, Aprotinina (bovino), trombina y cloruro de calcio	Reino Unido, Canadá, Irlanda y Estados Unidos	Hemorragia cardiacas solo para el sellado de la herida. Hemostasia en cirugías cardiacas y de bazo, como sellador en colostomía.
Tisseel Duo Quick	Baxter Hyland Immuno Glendale, California	Fibrinógeno, Fibronectina, Factor XIII, Plasminógeno, Aprotinina (bovino), trombina y cloruro de calcio	Sweden, Alemania	Hemorragia
Tissucol	Baxter Hyland Immuno Glendale, California	Fibrinógeno, Fibronectina, Factor XIII, Plasminógeno, Aprotinina (bovino), trombina y cloruro de calcio	Austria, Bélgica, Italia, España, Suiza, Sudáfrica, Sudamérica Francia	Hemostasia, Apoyo en la cicatrización de heridas, unir tejidos.
Tissucol Duo S	Baxter Hyland Immuno Glendale, California	Una fracción de proteínas del plasma, Fibrinógeno, Fibronectina, Factor XIII, Plasminógeno, Aprotinina (bovino), trombina y cloruro de calcio	Alemania	Heridas
Fibrin Sealant FS (humano)	Baxter Healthcare, Glendale, California	Fibrinógeno, Fibronectina, Factor XIII, trombina humana y cloruro de calcio	Estados Unidos	En ensayos clínicos
Hemaseel APR	Haemacture, Inc., Quebec, Canadá	Fibrinógeno, Fibronectina, Factor XIII, trombina (bovino) y cloruro de calcio	Canadá, Estados Unidos	Hemorragias
Hemaseel HMN	Haemacture, Inc., Quebec, Canadá	Fibrinógeno, Fibronectina, Factor XIII, trombina humana y cloruro de calcio	Canadá, Estados Unidos	En ensayos clínicos

Tabla 1. Adhesivos de fibrina tomado de Carl E et al. 1995.

La fibrina puede ser preparada de plasma autólogo y su uso puede ser agrupado en tres áreas: hemostasia, adherencia del injerto y acción antibacterial; también ha sido usada como andamios biológicos para células madre para regenerar tejido adiposo, hueso, tejido cardíaco, hígado, tejido nervioso, tejido ocular, piel, tendones y ligamento. Siendo un biopolímeros versátil (Llames S et al 2004).

Los geles de fibrina han sido preparados por diversos autores como Llames S et al, (2004) y Eyrich D et al, (2007) con fibrinógeno obtenido mediante crioprecipitación a partir de plasma humano. La crioprecipitación es un proceso normalmente usado en prácticas hematológicas y se obtiene gran cantidad de fibrinógeno, factor VIII, factor XIII y fibronectina. Aunque es difícil de obtener, la concentración constante de fibrinógeno varía entre 4 y 9mg/ml.

La arquitectura 3D de la matriz de fibrina es importante para la neoformación capilar y el crecimiento celular (Meana A et al 1998). En estudios recientes se ha demostrado que la fibrina no sólo facilita la proliferación de los queratinocitos en constructos de piel si no también provee un óptimo medio para su migración, proliferación y diferenciación. La migración y subsecuente proliferación es controlada por una variedad de factores de crecimiento (Lachlan J et al, 2001).

Los hidrogeles son una clase de biomateriales que tienen gran potencial de andamiaje en la aplicación de ingeniería de tejidos debido a su alto contenido de agua, biocompatibilidad, propiedades mecánicas que son paralelas a las propiedades de tejido suave, eficiente transporte de nutrientes y su biodegradación, así como la habilidad de encapsular células y ser inyectadas como líquido de gel in situ. Los geles de fibrina combinan algunas ventajas importantes como la alta eficacia en el sembrado celular y uniforme distribución de las células. Esta puede ser producida por la sangre del propio paciente y usada sin potencial de riesgo a cuerpos extraños e infección (Llames S et al 2004). La utilidad de la fibrina en ingeniería de tejidos puede ser extendida por la incorporación de la actividad biológica de otras proteínas derivadas de la MEC como: fibronectina, vitronectina, laminina y colágena o péptidos miméticos de la colágena como GFOGER (Llames S et al 2004).

MOLECULAS DE ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR

En la actualidad el diseño de biomateriales adecuados para la ingeniería de tejidos ha sido logrado a través del desarrollo de novedosos polímeros orgánicos sintéticos, nuevas cerámicas, compuestos de vidrio y recientes métodos para modificar metales y modificar superficies de óxidos metálicos. Esto ha ido de la mano con el incremento del conocimiento de la composición y arquitectura de la matriz extracelular (MEC) de varios tejidos y sus componentes macromoleculares.

Desentrañar los complejos mecanismos de señalización que envuelven la interacción entre células y su MEC ha resultado en la optimización de la biocompatibilidad y bioactividad de los materiales y sus superficies.

La adhesividad y bioactividad de los materiales se ha mejorado con la utilización de cubiertas de macromoléculas de la MEC, tales como fibronectina, laminina y colágena u otros epítopes de unión a integrinas incluyendo RGD y péptidos miméticos de la colágena.

De manera reciente un cambio en el concepto del diseño de materiales y superficies biomiméticos ha ocurrido con el reconocimiento y la importancia de la organización nanotopográfica de señales extracelulares de la matriz para la respuesta celular. La distribución espacial de epítopes de unión a células como RGD en fibronectina es difícil de obtener por la complejidad y la arquitectura irregular de la MEC, los arreglos espaciales de los epítopes podrían estar en distancias de nanoescala dentro de las dimensiones de las macromoléculas de la MEC. Por ejemplo, el arreglo escalonado dextrógiro de las moléculas de colágena I pronostica una presentación regular de los motivos de unión a integrinas a una distancia repetida de 67nm.

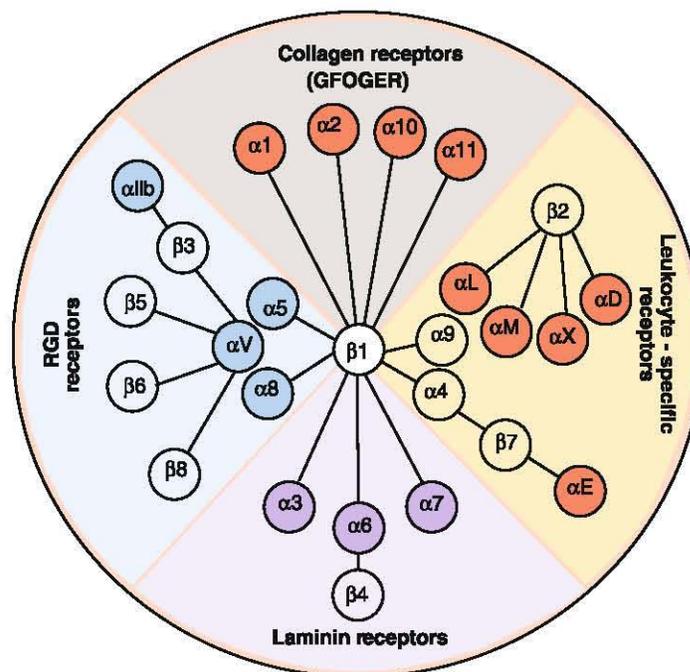
La adhesión celular, extensión, proliferación, migración, organización del citoesqueleto, diferenciación y apoptosis se ha demostrado que son influenciados por distintos nanomodelos de superficies biomiméticos con espacios arreglados de 15nm a 58nm, 100nm o 140nm.

La respuesta a nanoescalas ha sido reportada para todos los tipos celulares relevantes para ingeniería de tejidos, primeramente osteoblastos, células madre mesenquimales, células endoteliales, células de músculo liso y células nerviosas(Chen E *et al*, 1980; Lin L *et al*, 2008; Klaus von der M *et al*, 2011).

El comportamiento celular está directamente influenciado por proteoglicanos y glucoproteínas bioactivas incorporadas en las fibras de la MEC. (Klaus von der M *et al*, 2011) El espacio y densidad de los andamios fibrosos, su arquitectura 3D y el tipo de proteoglicanos y glucoproteínas no son solamente parámetros que definen las propiedades biomecánicas de la MEC; sus propiedades físicas y topográficas como elasticidad, dureza y espacio nanoescala, llevan información esencial para el comportamiento celular, migración, crecimiento y diferenciación de la matriz. Esta información es transmitida por complejos de adhesión basado en integrinas (Chen E *et al*, 1980; Lin L *et al*, 2008; Klaus von der M *et al*, 2011).

Integrinas

Las integrinas son receptores celulares de adhesión que son evolutivamente altamente preservadas. El nombre de integrinas fue dado por la importancia de estos receptores para mantener la integridad de la unión citoesqueleto-MEC. Las integrinas son heterodímeros compuestos por enlaces no covalentes de subunidades alfa y beta. En vertebrados, la familia está compuesta por 18 subunidades alfa y 8 subunidades beta que se pueden ensamblar en 24 diferentes heterodímeros como se puede observar en el siguiente esquema.



Esquema 1 . Representación de la familia de integrinas en vertebrados (tomado de Barczyk M *et al*, 2009).

Las integrinas pueden ser agrupadas de acuerdo a las propiedades de unión a ligandos o bien por la composición de sus subunidades como se representa en la tabla 2 y 3 (Popova S *et al*, 2007; Barczyk M *et al*, 2009).

Integrin	Human α chain characteristics	Cleavage	α I	Prototypic ligands/ recognition sequences	Additional ligands
$\alpha 1\beta 1$ (CD49a, VLA1)	1151 aa		X	collagens (collagen IV > collagen I (GFOGER); collagen IX)	semaphorin 7A
$\alpha 2\beta 1$ (CD49b, VLA2)	1181 aa		X	collagens (collagen I >collagen IV (GFOGER); collagen IX)	E-cadherin, endorepellin
$\alpha 3\beta 1$ (CD49c, VLA3)	1051 aa, splice variants $\alpha 3A$ and $\alpha 3B$	X		laminins (LN-511>LN-332>LN-211)	
$\alpha 4\beta 1$ (CD49d, VLA4)	1038 aa			fibronectin VCAM-1	
$\alpha 5\beta 1$ (CD49e, VLA5)	1049 aa	X		fibronectin (RGD)	endostatin
$\alpha 6\beta 1$ (CD49f, VLA6)	1073 aa, splice variants $\alpha 6A$ and $\alpha 6B$	X		laminins (LN-511>LN-332>LN-111>LN-411)	
$\alpha 7\beta 1$	1137 aa, splice variants X1, X2, $\alpha 7A$, $\alpha 7B$	X		$\alpha 7X1\beta 1$: laminins (LN-511>LN-211>LN-411>LN-111) $\alpha 7X2\beta 1$: laminins (LN-111>LN-211>LN-511)	
$\alpha 8\beta 1$	1025 aa	X		fibronectin, vitronectin, nephronectin (RGD)	
$\alpha 9\beta 1$	1035 aa			tenascin-C, VEGF-C, VEGF-D	
$\alpha 10\beta 1$	1167 aa		X	collagens (collagen IV> collagen VI >collagen II (GFOGER); collagen IX)	
$\alpha 11\beta 1$	1188 aa, inserted domain 21 aa		X	collagens (collagen I>collagen IV (GFOGER); collagen IX)	
$\alpha L\beta 2$ (CD11a)	1170 aa		X	ICAM-1, -2, -3, -5	
$\alpha M\beta 2$ (CD11b)	1153 aa		X	iC3b, fibrinogen + more	
$\alpha X\beta 2$ (CD11c)	1163 aa		X	iC3b, fibrinogen + more	
$\alpha D\beta 2$ (CD11d)	1162 aa		X	ICAM-3, VCAM-1	
$\alpha IIB\beta 3$ (CD41, GpIIb)	1039 aa	X		fibrinogen, fibronectin (RGD)	
$\alpha 6\beta 4$		X		laminins (LN-332, LN-511)	
$\alpha v\beta 1$ (CD51)	1048 aa	X		fibronectin, vitronectin (RGD)	
$\alpha v\beta 3$		X		vitronectin, fibronectin, fibrinogen (RGD)	tumstatin
$\alpha v\beta 5$		X		vitronectin (RGD)	
$\alpha v\beta 6$		X		fibronectin, TGF- β -LAP (RGD)	
$\alpha v\beta 8$		X		vitronectin, TGF- β -LAP (RGD)	
$\alpha E\beta 7$ (CD103, HML-1)	1178 aa	X	X	E-cadherin	
$\alpha 4\beta 7$				MadCAM-1, fibronectin, VCAM-1	

Tabla 2. Características de la subunidad α . Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>; Barczyk M *et al* (2009).

Integrin β chain	Characteristics	Notes
$\beta 1$ (CD 29, Gp IIa)	798 aa, splice variants $\beta 1A$, $\beta 1B$, $\beta 1C$, $\beta 1D$	Splice variants $\beta 1B$ and $\beta 1C$ not present in mice, minor variants with unclear function
$\beta 2$ (CD18)	769 aa	
$\beta 3$ (CD 61, GP IIIa)	788 aa, splice variants $\beta 3A$, $\beta 3B$ and $\beta 3C$	$\beta 3A$ major form
$\beta 4$ (CD104, TSP-180)	1875 aa, splice variants $\beta 4A-E$	$\beta 4A$ and $\beta 4B$ major forms, similar function
$\beta 5$	799 aa, splice variants $\beta 5A$, $\beta 5B$	Both splice variants have similar functions
$\beta 6$	788 aa	
$\beta 7$ (LPAM-1, βP)	798 aa	
$\beta 8$	769 aa	

Tabla3. Características de la subunidad β . Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>; Barczyk M et al (2009).

La primera función establecida de las integrinas fue la unión entre MEC y el citoesqueleto. Para la mayoría de las integrinas la unión es directamente a la actina, sin embargo algunas otras como la integrina $\alpha 6\beta 4$ se une directamente al sistema de filamentos intermedios. Recientemente la vimentina ha mostrado ser dependiente de la integrina $\beta 3$ para su reclutamiento en la superficie celular. Algunos componentes de sus mecanismos de unión, como talina juegan un doble papel y también toman parte en la activación de integrinas en mecanismos de señalización. Las integrinas pueden actuar como mecanosensores y generar señales que afectan la fisiología de la célula y a las vías de señalización intracelular (Barczyk M et al, 2009).

Los receptores de integrinas son bidireccionales que involucran señales tanto extra como intracelulares. Las señales intracelulares principalmente actúan permitiendo que la integrina cambie de conformación. Talina, kindlins, filaminas, migfilina, FAK, también ILK pueden regular la activación de integrinas. La sobre unión de ligandos provoca que las integrinas sufran cambios conformacionales dirigidos por señales extracelulares. Estas activaciones dependen de otros receptores de señal y sistemas de señalización disponibles dentro de la célula.

Algunas integrinas, en particular la $\beta 2$ está involucrada en la interacción célula-célula (Barczyk M et al, 2009; Manzanares M et al, 2009; Klaus von der M et al, 2010).

La unión a la colágena de las integrinas se basa en el reconocimiento de la triple hélice de la secuencia GFOGER y sus variaciones en la secuencia de la colágena. Mediante el análisis de la

secuencia peptídica y la estructura cuaternaria de los sitios de unión a la colágena y sus mutaciones han permitido diseñar y construir modelos peptídicos en los cuales GFOGER está presente como un dominio de interacción celular para ser expuesto como una unidad (cada unidad de microfibrillas es compuesta de 5 monómeros de colágena de triple hélice), permitiendo la unión a integrinas. Sin embargo el número de componentes de fibrillas en la matriz puede ser influenciado por la disponibilidad de estos sitios (Barczyk M *et al*, 2009; Klaus von der M *et al*, 2010).

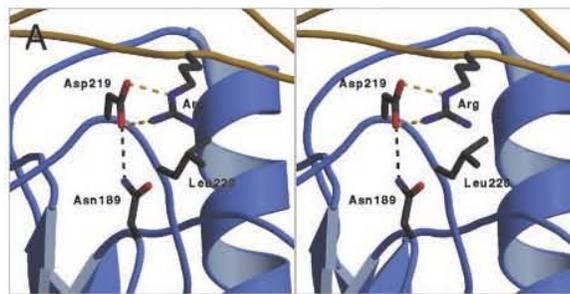
GFOGER

Además de la interacción inicial entre el biomaterial y las células, los andamios deben permitir una fuerte adhesión, por lo que con el fin de incrementar esta propiedad se ha evaluado la estrategia de recubrir la superficie de algunos materiales con macromoléculas de la MEC como lo son: fibonectina, elastina, laminina, y colágena o sus epítopes de uniones a integrinas RGD, YIGSR y GFOGER (Barczyk M *et al*, 2009; Klaus von der M *et al*, 2010).

Los distintos tipos de colágena dependiendo de su correspondiente secuencia peptídica muestran diversos patrones de polimerización formando distintos arreglos supramoleculares (fibrillas y fibras) que son su forma funcional en el tejido. La forma mejor caracterizada y más común de la colágena tipo I es su periodicidad axial cada 67nm. Alrededor del 15 al 20% de todos los residuos dentro de la colágena son Lys, Arg, Glu o Asp, lo que permite su interacción con las integrinas presentes en numerosos estirpes celulares (Emsley J *et al*, 2004). En este sentido la colágena constituye una familia de moléculas abundantes en la MEC que contribuye significativamente en la integridad y propiedades mecánicas de los tejidos como hueso, dermis, cartílago y tendones. También juega un papel fundamental en la adhesión celular y vías de señalización intracelulares. Los receptores de colágena tipo I son reconocidos por las integrinas como $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ y $\alpha 11\beta 1$ median la adhesión celular a través de la colágena y activan señales de transducción citoplasmática.(Zhang W *et al*, 2003; Emsley J *et al*, 2004; Dobler D *et al*, 2006; Reyes C *et al*, 2007; Popova S *et al*, 2007). La integrina $\alpha 3\beta 1$ no interactúa directamente con la colágena, pero lo hace con el receptor de laminina que puede afectar al receptor de colágena $\alpha 2\beta 1$ (Zhang W *et al*, 2003), por lo que en el desarrollo de biomateriales con fines de trasplante, diversas secuencias de unión intercelular presentes de manera

constitutiva en los elementos de la MEC como: RGD, P-15 y GFOGER han sido usadas para otorgar biofuncionalidad a la ingeniería de biomateriales que asemejen a las características bioadhesivas de la MEC (Shih Tak K *et al*, 2007).

GFOGER, es una secuencia de la colágena que corresponde a los siguientes aminoácidos Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg que se localizan en la posición 502 a 507 de la cadena alfa de la colágena tipo I. Las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ y $\alpha 11\beta 1$ reconocen los residuos de la secuencia GFOGER mimético de la colágena como se puede observar en el esquema 2 (Zhang W *et al*, 2003; Emsley J *et al*, 2004; Dobler D *et al*, 2006; Reyes C *et al*, 2007; Popova S *et al*, 2007). Aunque cabe señalar que su interacción con distintas integrinas depende de la integridad de la secuencia y por tanto de su estructura tridimensional.



Esquema 2. Interacción entre Arginina del GFOGER con la integrina $\alpha 2$ en el dominio I tomado de Zhang W *et al*

En los estudios realizados por Knight C *et al* (2000), se demostró que la sustitución de alguno de los aminoácidos en GFOGER conduce a un cambio conformacional del péptido y por tanto no puede ser reconocido por las integrinas, el reconocimiento de esta secuencia es enteramente dependiente de la conformación en triple hélice del péptido, lo que se evidenció sustituyendo el ácido glutámico por aspartato.

La sustitución de R por K en GFOGER conduce a la pérdida de reconocimiento de la dominio A de la cadena $\alpha 2$, pero $\alpha 2\beta 1$ que median la adhesión celular fue reducida a la mitad. La razón de esto no es clara pero sugiere que los requerimientos estructurales de reconocimientos aislados del dominio A son más estrictos que el reconocimiento del dominio dentro de la integrina intacta de la membrana celular (Knight C *et al*, 2000). El ácido glutámico del motivo de la colágena de la cadena GFOGER puede coordinarse con el ión metálico dentro del motivo MIDAS. (Emsley J *et al*, 2000; Zhang W *et al*, 2003; Emsley J *et al*, 2004). La subunidad

$\beta 1$ de la integrina contiene un Mg^{2+} coordinado con MIDAS que es un motivo de unión a un metal dentro de esta subunidad (Zhang W et al, 2003; Barczyk M et al, 2009).

La integrina $\alpha 2\beta 1$, que es el receptor primario de colágena tipo I, es abundantemente expresada en plaquetas, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, células epiteliales y linfocitos. En osteoblastos La integrina $\alpha 2\beta 1$ media la adhesión a la colágena tipo I, activa la vía de señalización Runx2/Cbfa 1, factor de transcripción que controla la diferenciación osteoblástica y la mineralización de la matriz (Zhang W et al, 2003; Reyes C et al, 2004; Reyes C et al, 2007). La interacción entre la colágena y la $\alpha 2\beta 1$ induce diferenciación osteoblástica en células estromales de médula ósea multipotente (Reyes C et al, 2004; 2007; Hennessy K et al, 2009). La integrina $\alpha 2\beta 1$ mediante la unión a la colágena tipo I estimula la fosforilación de tirosinas de Cinasas de Adhesión Focal (FAK) y subsecuentemente la activación de señales extracelulares relacionados a la cinasa (ERK), cinasa de proteína activada a mitógenos (MAPK) que ha sido implicado en el control de expresión de genes específicos de osteoblastos matriz mineralizada (Reyes C et al, 2004). El promotor $\alpha 10$ está activado en condrocitos en cartílago unión, columna vertebral, tráquea y en el cartílago de los bronquios, mientras que el $\alpha 11$ está activado en fibroblastos (Popova S et al, 2007). Por lo anterior, la incorporación de motivos discretos de adhesión celular, como GFOGER en biomateriales y superficies ofrece una estrategia para mejorar la interacción material-célula promoviendo una adhesión celular específica.

Los estudios de integrinas unidos a colágena muestran que son fundamentales en la adhesión celular, migración celular, control de síntesis de colágena, síntesis de metaloproteínas, remodelación de la matriz de colágena, en la proliferación y diferenciación celular, angiogénesis, adhesión y agregación plaquetaria y tubulogénesis epitelial (Zhang W et al, 2003). La presencia de secuencias cortas como RGD, puede resultar en la pérdida completa de actividad biológica por la ausencia de dominios funcionales adicionales presentes en la estructura original tridimensional de las moléculas de la MEC (Reyes C et al, 2003). El uso de GFOGER promueve la activación biológica por sus repeticiones de aminoácidos GXY que semejan a la colágena (Reyes et al, 2003; Raynor J et al, 2009).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La osteoporosis, fracturas difíciles, enfermedad periodontal, entre otras patologías requieren de reparación del tejido óseo. La cirugía reconstructiva para la reparación y corrección de tejido óseo perdido ha llevado a la búsqueda de materiales que faciliten la recuperación de los pacientes que sufren estas afecciones. En este sentido, la ingeniería de tejidos aplica los principios de la ingeniería, de la ciencia de materiales y de las ciencias biológicas, para la obtención de sustitutos biológicos que puedan restaurar, mantener o mejorar la función tisular. La fibrina, la cual es usada en cirugía para hemostasia, es un material seguro y biodegradable que no induce reacción causada por material extraño y ha llegado a ser un vehículo para transportar factores de crecimiento y células.

Por otro lado, el GFOGER es una molécula mimética de la colágena que puede inducir crecimiento y diferenciación de osteoblastos. Así, se hace necesario evaluar la actividad biológica de la fibrina con GFOGER, para inducir la diferenciación y proliferación de las células estromales de médula ósea a osteoblastos y la mineralización de matriz orgánica para que posteriormente pueda ser utilizado en defectos óseos.

HIPOTESIS

Si a un andamio de fibrina y GFOGER se le colocan células estromales de médula ósea, la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la calcificación de la matriz aumentarán en comparación con un andamio de fibrina sin GFOGER.

OBJETIVO GENERAL

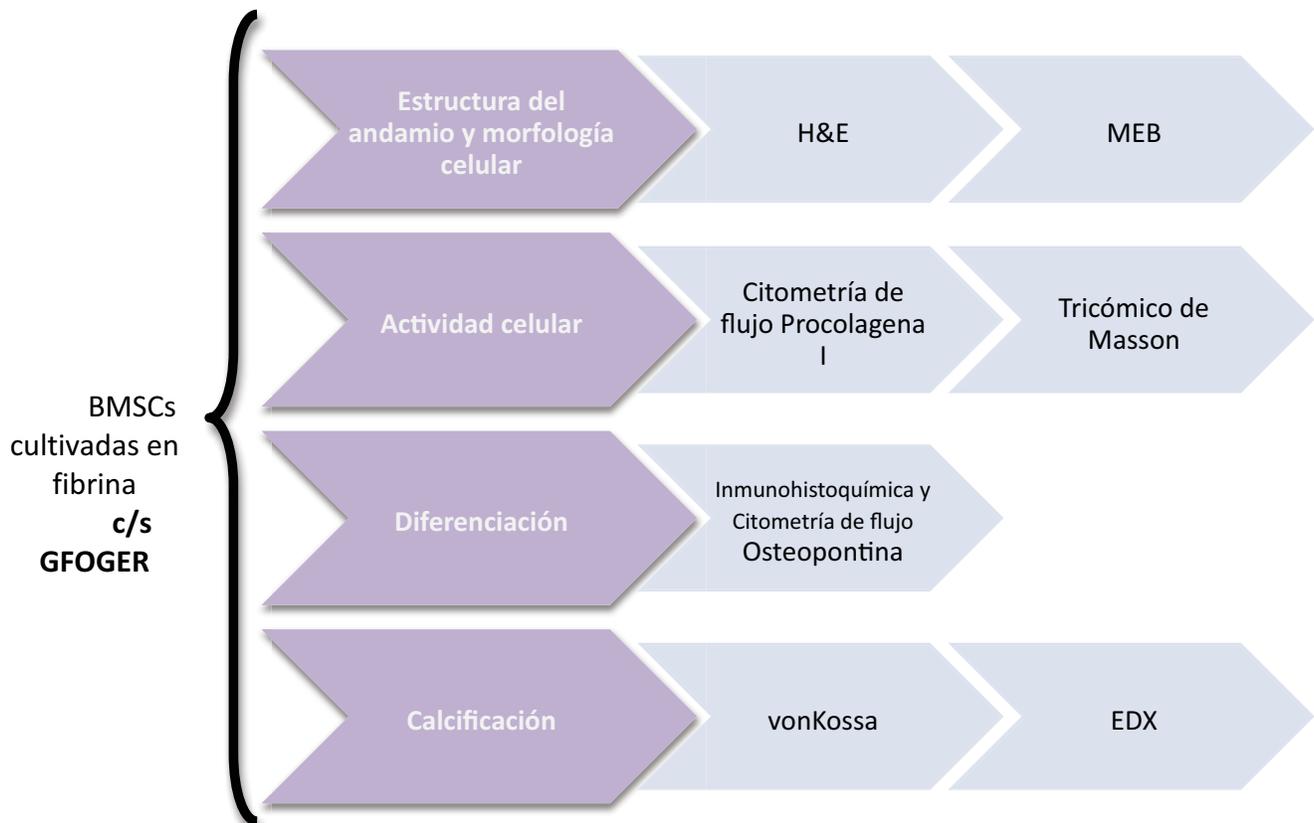
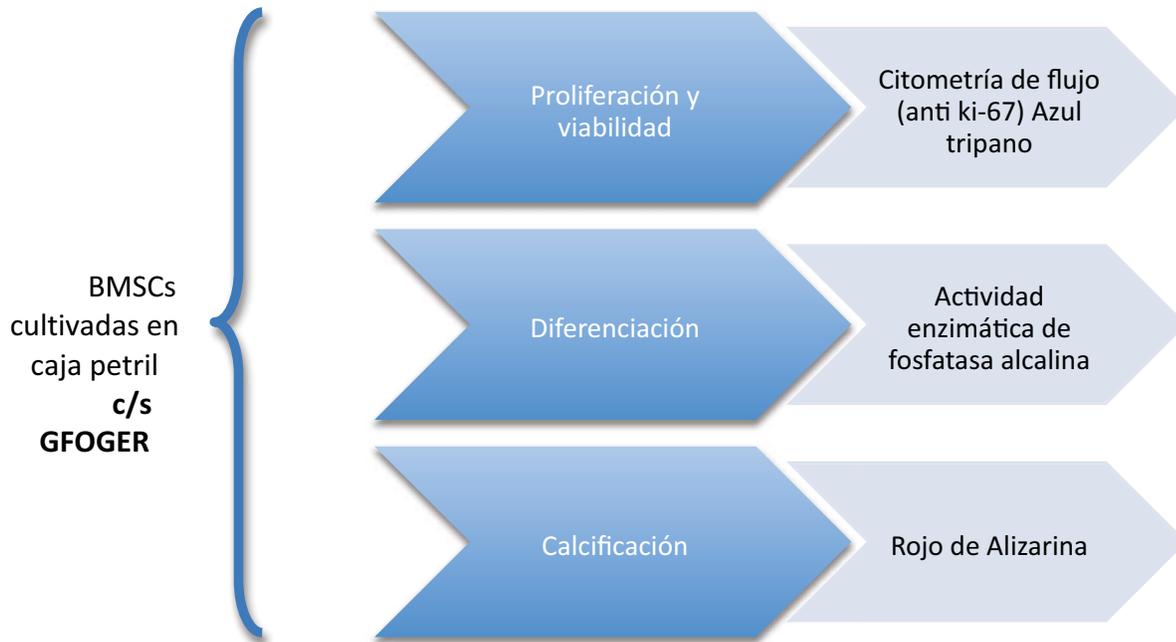
Evaluar la formación de tejido óseo en un andamio de fibrina suplementado con el péptido mimético de la colágena GFOGER en el que se han sembrado células estromales de médula ósea (BMSCs).

Objetivos específicos

1. Evaluar la diferenciación de osteoblastos a partir de células estromales de médula ósea incluidas en un andamio de fibrina con GFOGER.
2. Evaluar la proliferación de osteoblastos a partir de células estromales de médula ósea incluidas en un andamio de fibrina con GFOGER.
3. Evaluar la calcificación de la matriz ósea secretada por osteoblastos a partir de células estromales de médula ósea incluidas en un andamio de fibrina con GFOGER

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental



Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa Balb-c, de seis a ocho semanas de edad, que fueron mantenidos bajo condiciones libres de pirógenos, con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum* con nutricubos “purina chow” y ciclos de luz oscuridad controlados, en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. El sacrificio de los animales se realizó de acuerdo a los lineamientos de los comités de ética de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Obtención y purificación de células.

Para cada ensayo se sacrificaron 4 ratones, de los cuáles se obtuvieron las tibias y fémures. Una vez retirado el tejido muscular, los huesos se transfirieron a una solución de alcohol al 70% para eliminar la contaminación de la manipulación; posteriormente se lavaron en PBS estéril. Así, se siguió el método de Wakitani (1995) con el cual se obtienen células de médula ósea por perfusión, es decir, se seccionan los fémures y tibias a nivel de las metafisis y a continuación, con una jeringa de 5 cm CC., se hace pasar una solución de medio de cultivo (DMEM /Suero fetal bovino (SFB) 10%/ antibiótico (Ab) al 1%) por uno de los extremos, mientras que por el otro extremo se colecta en un tubo que seguidamente se centrifuga a 1200 rpm con el propósito de obtener las células de la médula ósea. Finalmente se lisaron los eritrocitos incubando durante 3min con un amortiguador de lisis de eritrocitos, se lavaron con PBS por centrifugación a 1200rpm durante 10 minutos.

La suspensión celular fue cultivada durante 24 horas en DMEM/SFB 10%/Ab 1% para permitir que las células estromales se adhirieran a la caja. A continuación se retiró el sobrenadante así como las células no adherentes, mediante 3 lavados sucesivos con HBSS. Se consideró que las células adheridas son células estromales de médula ósea (BMSCs), las cuales fueron expandidas por cultivarlas en DMEM/ SFB al 10%/Ab al 1% hasta su utilización en los cultivos experimentales.

Experimentos de BMSCs cultivadas en caja petril c/s GFOGER

Proliferación y viabilidad celular

Se obtuvieron las BMSCs de 6 ratones y se hizo viabilidad celular con azul de tripano en la cámara de Neubauer y se cultivaron 1×10^6 células en cajas de 6 pozos de la siguiente manera:

1	DMEM /AA/DX	SFB 2%	GFOGER
2	DMEM /AA	SFB 2%	GFOGER
3	DMEM	SFB 2%	GFOGER
4 CONTROL	DMEM /AA/DX	SFB 10%	SIN GFOGER
5 CONTROL	DMEM	SFB 10%	SIN GFOGER

DMEM/SFB 10%/Ab 1%

Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM)

Ácido ascórbico (AA) 50 mg/ml

Dexametasona (Dx) 10nM.

Los grupos experimentales para los ensayos de proliferación fueron por triplicado y cultivados a 0, 1, 2, 3, 4, 5 días; las células se despegaron con tripsina al 0.5% y con EDTA al 0.02% por 10min. Se obtuvo el sobrenadante y se tiñeron las células para ser leídas por citometría de flujo.

Se diseñaron los siguientes grupos para comparar el efecto del GFOGER en condiciones normales:

1	DMEM	SFB 10%	GFOGER
2	DMEM	SFB 10%	SIN GFOGER

Los grupos experimentales fueron por triplicado y cultivados a: 1, 2, 4 y 7 días y fueron procesados para citometría de flujo.

Preparación de las muestras para Citometría de flujo.

La proliferación celular fue demostrada por medio de la expresión de la proteína Ki67 presente en las fases G1, S y G2 así como también en M. Ki-67 es un excelente marcador para determinar la fracción de crecimiento de una población celular determinada.

Por ejemplo, es habitual que en los hospitales se cuantifique la fracción de células Ki-67-positivas tumorales (el Ki-67 etiquetado) que a menudo se correlaciona con la evolución clínica del cáncer. Los ejemplos mejor estudiados en este contexto son los carcinomas de próstata, de cerebro y de mama. Para estos tipos de tumores, el valor pronóstico para la supervivencia y la recurrencia del tumor han sido repetidamente demostrado en análisis uni y multivariados. El nombre se deriva de la ciudad de origen (Kiel, Alemania) y el número de la copia original de la placa de 96 pocillos (Scholzen T et al, 2000). Se utilizó el anticuerpo Anti-Ki67 (Novus Biological) una concentración de 1:400.

Tras despegar las células de la placa, la suspensión celular fue colocada en tubos de 1.5mL y fueron lavadas 3 veces con amortiguador de tinción; se les colocó 100ml de BD Cytotfix/Cytoperm™ kit por 20min a 4°C, para permeabilizar y fijar las células; después se hicieron 2 lavados con BD Perm/Wash™ y fueron incubadas con el Anti- Ki67 por 15min; después fueron lavadas 3 veces con amortiguador de tinción. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario Anti-Rabbit (MP Biomédical kit) por 15 min, lavadas 3 veces con amortiguador de tinción. Finalmente fueron incubadas con el anticuerpo Estravidina/ PE 1:300 por 15 min, lavadas con el amortiguador de tinción y resuspendidas en amortiguador de fijación.

Las lecturas se efectuaron en el citómetro BD FACSCallibur y los datos fueron analizados con el software FlowJo 8.7.

Diferenciación

Se obtuvieron las BMSCs de 4 ratones y se cultivaron 1×10^6 células en cajas de 6 pozos de la siguiente manera:

Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM)
 Ácido ascórbico (AA) 50 µg/ml
 Dexametasona (Dx) 10nM

1	DMEM /AA/DX	SFB 10%	GFOGER
2	DMEM /AA	SFB 10%	GFOGER
3	DMEM	SFB 10%	GFOGER
4	DMEM /AA/DX	SFB 10%	SIN GFOGER
5	DMEM	SFB 10%	SIN GFOGER

Los cultivos celulares de 14 días, fueron lavados con PBS y fijados con formol amortiguado por 24 horas, después fueron lavados 3 veces y se incubaron con cloruro de magnesio en un amortiguador de Tris Maleato toda la noche para después ser incubadas por 2 horas con el kit NBT (ZYMED), para evaluar la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, las muestras fueron lavadas con agua destilada y observadas en el microscopio.

Calcificación

Se obtuvieron las BMSCs de 4 ratones y se cultivaron 1×10^6 células en cajas de 6 pozos de la siguiente manera:

1	DMEM /AA/DX	SFB 10%	GFOGER
2	DMEM /AA	SFB 10%	GFOGER
3	DMEM /AA/DX	SFB 10%	SIN GFOGER
4 CONTROL	DMEM	SFB 10%	SIN GFOGER

Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM)

Ácido ascórbico (AA) 50 µg/ml

Dexametasona (Dx) 10nM

Los cultivos celulares de 24 días, fueron lavados con PBS y fijados con formol amortiguado por 24 horas, después fueron lavados 3 veces y se incubaron con la solución rojo de alizarina S por 5 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de teñir los precipitados de calcio, finalmente se lavaron las muestras con agua destilada y se observaron al microscopio.

Experimentos de BMSCs cultivadas en andamios de fibrina c/s GFOGER

Andamios de fibrina.

Los andamios de fibrina se construyeron de la siguiente manera:

Se utilizó plasma sanguíneo humano donado por el banco de sangre del Hospital General de México, el cual fue obtenido de sangre anticoagulada con citrato de sodio 0.1M. Para la construcción del andamio, al plasma se le añadió la suspensión celular previamente obtenida de médula ósea (50,000 cel/ml), cloruro de sodio al 0.9%, Ac. tranexámico y cloruro de calcio al 1%.

Andamios de fibrina con GFOGER.

El péptido mimético de la colágena **GFOGER**, descrito por Reyes *et al* (2002), se añadió al andamio de fibrina a una concentración de 0.03 mg/ml.

Estructura de distintos andamio y morfología de BMSCs

Las BMSCs fueron sembradas 1×10^6 células sobre 3 distintos andamios β -TCP, colágena y fibrina para comparar su adhesión e integración. Cultivadas con y sin GFOGER por 14 y 24 días en medio:

DMEM /AA/DX

DMEM /AA

DMEM

Las muestras fueron fijadas con formol amortiguado por 24 horas y procesadas para obtener cortes de parafina de 5 micras y teñidas con H&E. Otras muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% por 1hora y fueron procesadas para observarlas en microscopía electrónica de barrido

Grupo Experimental.

A partir de los cultivos de BMSCs se obtuvo una suspensión celular, la cuál se dividió en los siguientes grupos experimentales:

1	DMEM /AA/DX	SFB 10%	GFOGER
2	DMEM /AA	SFB 10%	GFOGER
3	DMEM /AA/DX	SFB 10%	SIN GFOGER
4 CONTROL	DMEM	SFB 10%	SIN GFOGER

Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM)
Ácido ascórbico (AA) 50 µg/ml
Dexametasona (Dx) 10nM

Los grupos experimentales se hicieron por triplicado y se llevaron a 24 días de cultivo

Actividad celular en andamios de fibrina

Para evaluar procolágena I las células fueron leídas en citometría de flujo con la misma técnica de preparación de las muestras para citometría de flujo descrita previamente en proliferación. Las muestras fueron fijadas con formol amortiguado por 24 horas y procesadas para obtener cortes de parafina de 5 micras, teñidas con tricómico de Masson y hacer técnica de inmunohistoquímica.

Técnica de Inmunohistoquímica para Osteopontina y Procolagena I.

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados hasta agua destilada. Las muestras fueron bloqueadas para inhibir la peroxidada endógena con albumina 0.05% por 10min, después fueron lavadas 3 veces por 3 minutos con PBS, para permeabilizarlas con PBS tritón 0.2% por 5 minutos a temperatura ambiente, fueron lavadas 3 veces por 3 minutos con PBS, nuevamente las muestras fueron bloqueadas, con PBS/Albúmina 0.1%/Twinn 20 al 0.05% por 10 minutos a temperatura ambiente, fueron lavadas e incubadas toda la noche con el anticuerpo Anti-Osteopontina (Abcam) 1:200 y Anti- Procolagena tipo I (Santa Cruz) 1:200 toda la noche a 4°C. La muestras fueron lavadas se bloqueó con PBS/Albúmina 0.1%/Twinn 20 al 0.05% por 10 minutos para posteriormente ser incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo y anti-cabra (MP Biomedicals kit) por 1 hora a 37 °C, se lavaron con PBS y se reveló con diamino bencidina (Zymed) 5 minutos a temperatura ambiente, finalmente fueron contrateñidas con hematoxilina y montadas para ser observadas en el microscopio óptico.

Diferenciación y Calcificación

Se evaluó osteopontina por citometría de flujo con la misma técnica de preparación de las muestras para citometría de flujo descrita previamente en proliferación.

Otras muestras fueron fijadas con formol amortiguado por 24 horas y procesadas para obtener cortes de parafina de 5 micras, teñidas con Vonkossa para evidenciar la presencia de calcio y hacer técnica de inmunohistoquímica para osteopontina como ya se explicó.

ANALISIS ESTADISTICO

Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico Prisma. Se empleó el Análisis de Varianza (ANOVA) prueba de Dunn y t de Student.

RESULTADOS

Obtención de células estromales a partir de médula ósea (BMSCs)

Este experimento se llevó a cabo con el propósito de asegurar una adecuada obtención en número de células estromales de médula ósea, asimismo se realizó con el objetivo de estandarizar la técnica. Con esta metodología en los primeros ensayos se obtuvieron muy pocas células totales de médula ósea, como se puede observar en la **figura 1**. Sin embargo a medida que se repitió el ensayo se obtuvieron números mayores llegando a obtener 6×10^7 células. Con lo anterior se pudo asegurar que el siguiente paso, la obtención de las células estromales de médula ósea, fuera viable. En la **figura 1a** se muestran los datos de 5 ensayos realizados y una fotomicrografía de células totales de médula ósea obtenida con este procedimiento.

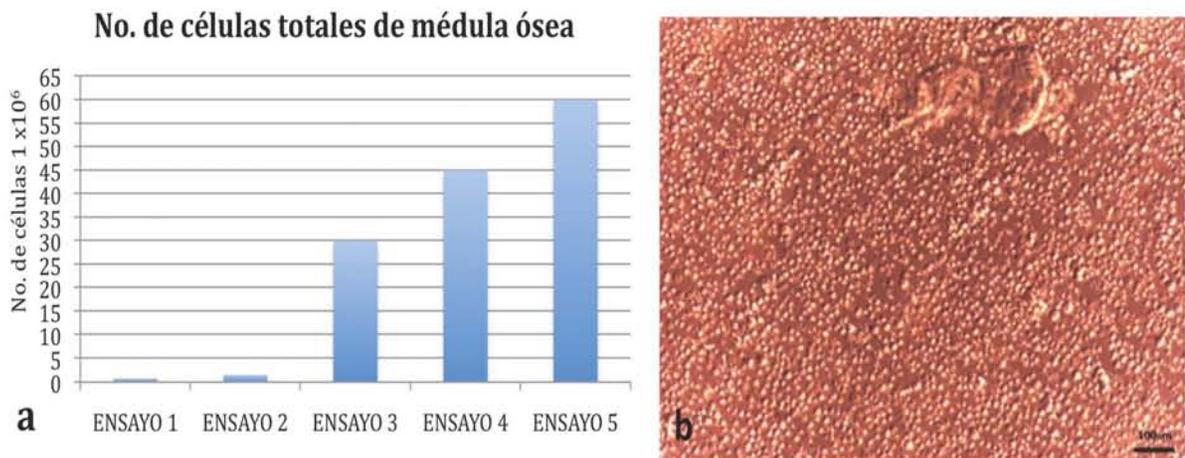


Figura 1. Ensayos de obtención de células totales de médula ósea (CTMO). En la figura "a" se muestran 5 ensayos de obtención de células totales de médula ósea con una viabilidad del 95%. Es de notar que los últimos ensayos muestran una diferencia notable con los primeros. En "b" se muestra una fotomicrografía de las células obtenidas del 5º ensayo mostrado en "a". El número de células se cuantificó mediante una cámara de Neubauer. Fotomicrografía realizada con técnica de Relief (contraste modulado de Hoffman, Olympus), 4X.

Así, con los ensayos ya estandarizados de obtención de CTMO como se muestra en la **figura 1a** se procedió a aislar a las células estromales. Las células estromales fueron obtenidas dejando cultivar las células totales de médula ósea durante 24 horas en un plato de cultivo de plástico. Al finalizar el tiempo, se observó una población celular que se adhirió a la caja Petri. Las células no adheridas fueron desechadas, mientras que las adheridas se consideraron como

células estromales de médula ósea (Georgen F *et al*, 1997; Jaiswal N *et al*, 1997; Seok-Jung K *et al*, 2008; Lindner U *et al* 2010) y fueron utilizadas para los experimentos de diferenciación hacia osteoblastos.

Se realizaron varios ensayos para obtener el mayor número de células estromales de médula ósea. En los primeros ensayos se obtuvieron pocas células, aproximadamente de 1 a 2 x 10⁵ células, sin embargo, en los últimos ensayos se obtuvieron consistentemente cifras de aproximadamente 1.5 X 10⁶ células (**figura 2a**). Por otro lado, es de notar que la forma de estas células fue de huso, semejando fibroblastos (**figura 2b**).

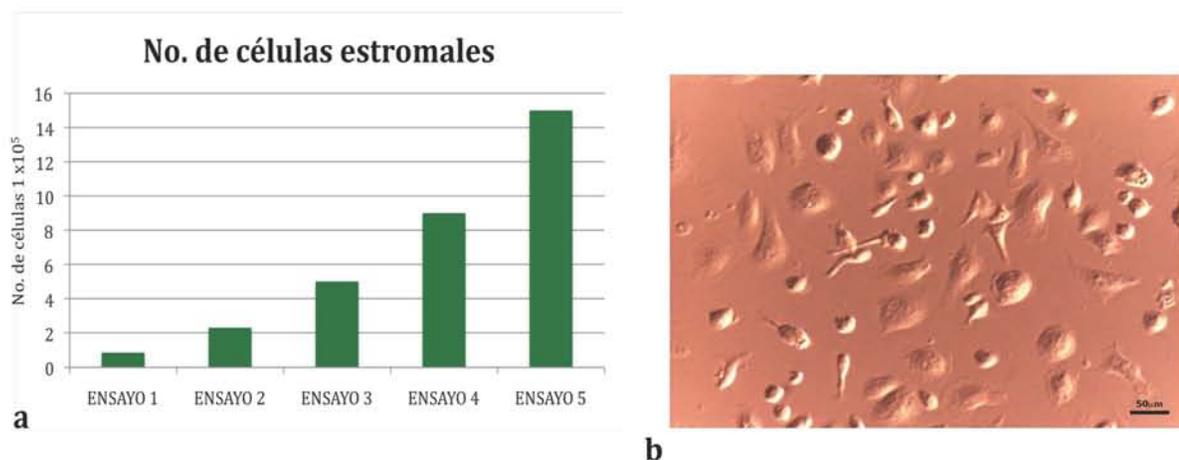


Figura 2. Cuantificación de células estromales de médula ósea. En “a” se puede observar que a medida que se fueron practicando las repeticiones el número de células aumentó considerablemente, lo cual permitió llevar a cabo los experimentos posteriores obteniendo siempre una viabilidad del 95%. En “b” se pueden observar células de aspecto ahusado adheridas a la superficie de la caja de cultivo. El número de células se cuantificó mediante una cámara de Neubauer. Fotomicrografía realizada con técnica de Relief (contraste modulado de Hoffman, Olympus), 4X.

Con estos datos se realizaron los experimentos posteriores de este trabajo. Por otro lado, los métodos utilizados para obtener las células fueron consistentes en cuanto a la obtención de números de células. Es necesario agregar que la viabilidad celular también fue alta cuantificado por la incorporación de azul tripano, la cual fue siempre superior al 95%.

Determinación de proliferación celular.

Con objeto de analizar el efecto de la proteína GFOGER sobre la población de células estromales de médula ósea, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se evaluaron distintas condiciones de cultivo. Así, se tuvieron los siguientes grupos:

- 1) Medio de cultivo más suero fetal bovino al 10% (DMEM + SFB 10%) como control.
- 2) Ácido ascórbico, dexametasona y suero fetal bovino al 10% (DMEM/AA/DX/SFB 10%).
- 3) Suero fetal bovino al 2% más el péptido GFOGER (SFB2%/GFOGER).
- 4) Ácido ascórbico más suero fetal bovino al 2% más GFOGER (DMEM/AA/SFB2%/GFOGER).
- 5) Ácido ascórbico más dexametasona más suero fetal bovino al 2% más GFOGER (DMEM/AA/DX/SFB2%/GFOGER).

Para determinar la proliferación celular se evaluó la expresión de la proteína Ki-67 en las células estromales de médula ósea mediante citometría de flujo. La proteína Ki-67 es una proteína que en los humanos está codificada por el gen MKI67 (antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67)(Scholzen T *et al*, 2000).

Las células, después de ser incubadas en las diferentes condiciones de cultivo, fueron aisladas y procesadas para inmunotinción. A continuación las células fueron colocadas en un FACScalibur (BD). El resultado fue expresado en porcentaje celular. En la **figura 3** se puede observar que al 5º día de cultivo, con las condiciones de cultivo ya mencionadas, las BMSCs mantenidas exclusivamente con medio DMEM y suero fetal bovino al 10 % tuvieron una mayor proliferación en comparación con los otros grupos. Sin embargo, es de notar que el grupo DMEM/AA/SFB 2%/GFOGER está ligeramente por arriba de los otros grupos que también tenían GFOGER. Es necesario indicar que todas las condiciones salvo el control (SFB 10%) tenían suero fetal bovino al 2%. Es bien sabido que cuando a un cultivo celular se le incrementa la concentración de suero fetal bovino en el medio de cultivo, en las células se induce un incremento en la proliferación, situación que nosotros encontramos en este

experimento. En la **figura 3** se puede apreciar la gráfica de la expresión de Ki-67 al 5º día de cultivo con diferentes condiciones.

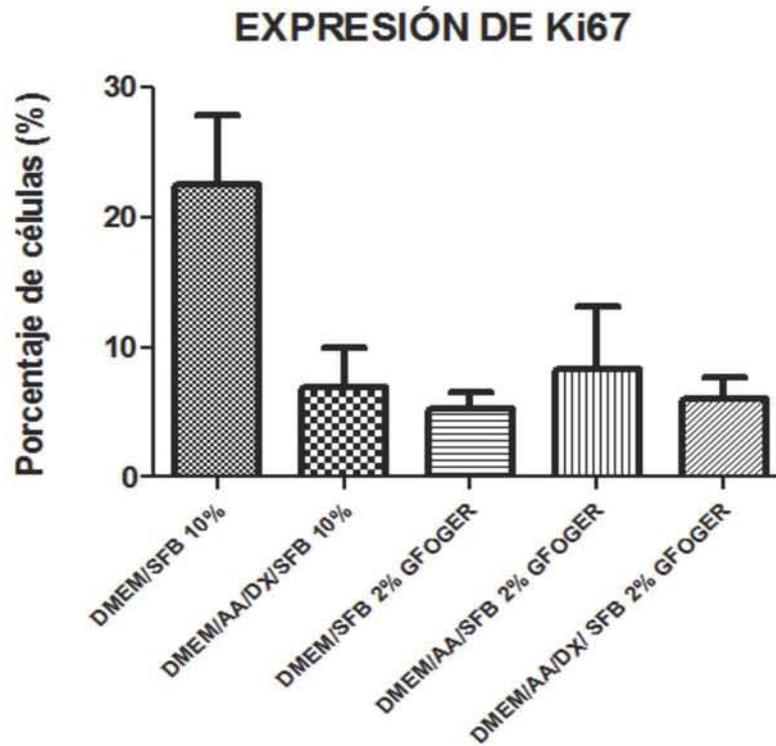


Figura 3. Gráfica de proliferación celular evaluada por la expresión de la proteína Ki-67 mediante citometría de flujo. 5º día de cultivo. Se puede observar que las células cultivadas con suero fetal bovino al 10% presentan una gran proliferación. En contraste todos los otros medios de cultivo no indujeron una proliferación significativa. Sin embargo, la condición que tuvo un pequeño aumento en comparación con las otras condiciones fue la de DMEM/AA/SFB2%/GFOGER. La diferencia no fue significativa entre los grupos experimentales. $p > 0.05$ (AA: ácido ascórbico; DX: Dexametasona; DMEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco; SFB: Suero fetal bovino).

Con los datos anteriores, y debido a que cuando se reducen las concentraciones de suero fetal bovino al 2% las células son sometidas a estrés, se diseñó otro experimento en el que todos los medios de cultivo contuvieran suero fetal bovino al 10% con y sin GFOGER. Así, se cuantificó la expresión de Ki-67 mediante citometría de flujo a diferentes días de cultivo (1, 2, 4 y 7) (**figura 4**). Los datos fueron expresados en porcentaje de células positivas a Ki-67. Los datos de este experimento mostraron que hubo un incremento en todos los casos donde al

medio de cultivo se le añadió GFOGER. Este aumento fue significativo en todos los casos con respecto a su control y en todos los días de los cultivos, aunque la significancia fue menor al día 7º de cultivo.

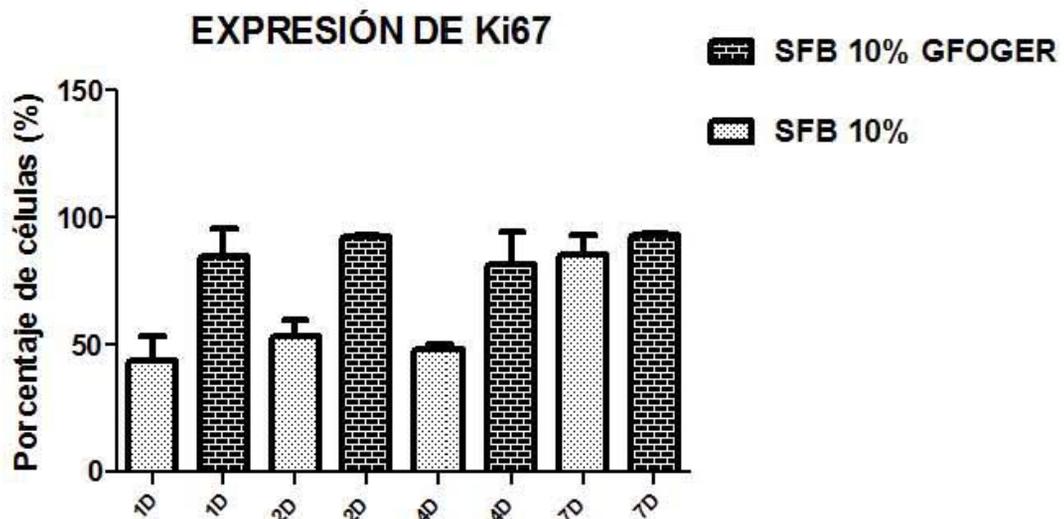


Figura. 4. Gráfica de cuantificación de la expresión de la proteína Ki-67 en células estromales de médula ósea a diferentes días de cultivo con y sin GFOGER en el medio de cultivo. Se puede observar que en todas las condiciones donde se agregó el péptido GFOGER al medio de cultivo, y en todos los días, se indujo un efecto proliferativo en las células estromales de médula ósea. $P < 0.05$. En las condiciones de cultivo en las que se añadió GFOGER, no existió significancia entre ellas a los diferentes días. D=días

Demostración de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en células estromales de médula ósea (Diferenciación)

La enzima fosfatasa alcalina es una ectoenzima que está presente en la membrana plasmática de osteoblastos. Así, ésta enzima es un marcador de actividad osteoblástica. La presencia de la enzima se puede analizar de manera sencilla mediante una técnica de histoquímica enzimática. Con el propósito de analizar la actividad de los osteoblastos derivados de células estromales de médula ósea. Se colocaron varios cultivos en condiciones de medio con y sin GFOGER y al día 14 de cultivo los cultivos fueron procesados para realizar en ellos una histoquímica enzimática para fosfatasa alcalina.

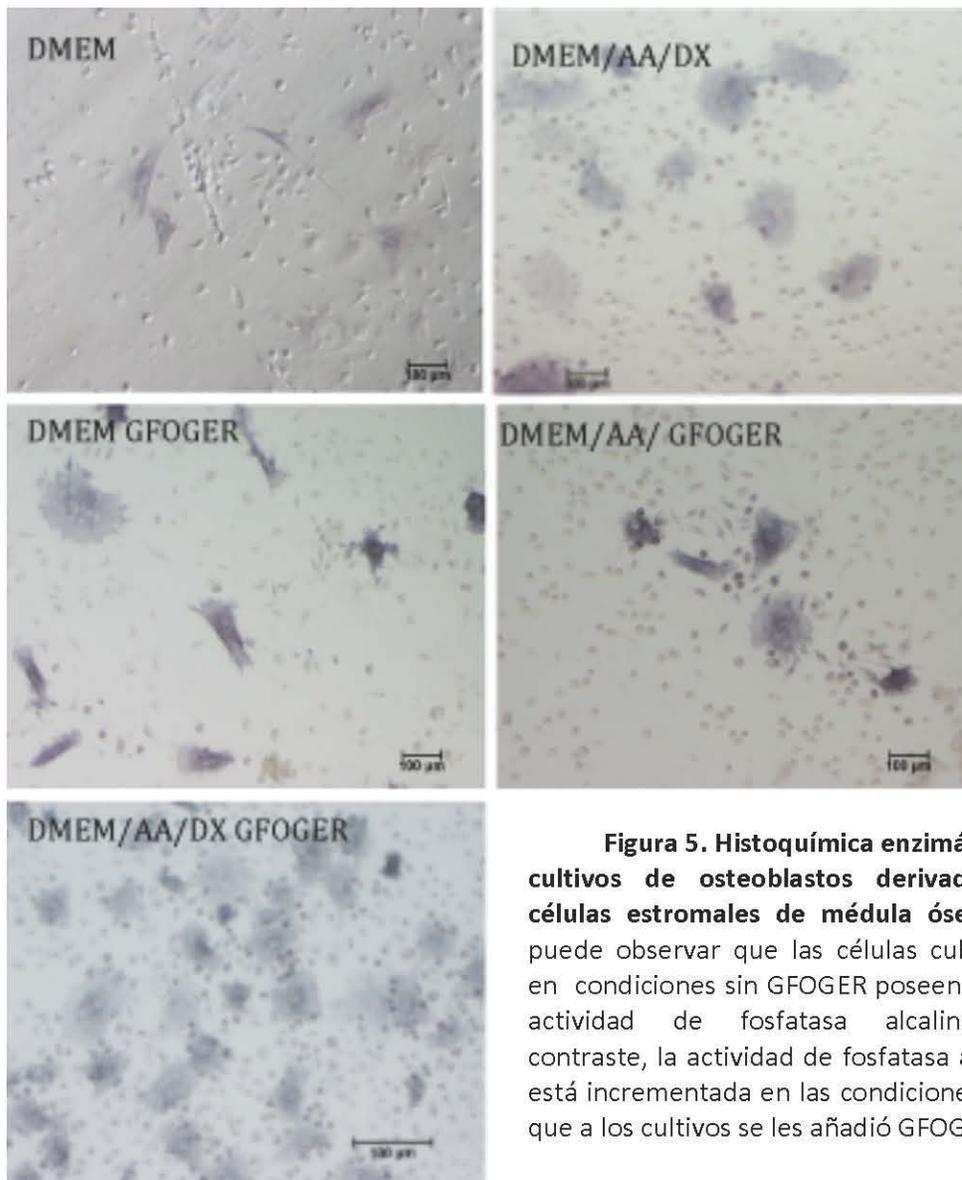


Figura 5. Histoquímica enzimática en cultivos de osteoblastos derivados de células estromales de médula ósea. Se puede observar que las células cultivadas en condiciones sin GFOGER poseen menor actividad de fosfatasa alcalina. En contraste, la actividad de fosfatasa alcalina está incrementada en las condiciones en la que a los cultivos se les añadió GFOGER.

En la **figura 5** se puede observar la actividad de fosfatasa alcalina en distintas condiciones con y sin GFOGER. Es de notar que en los casos en los que no se adicionó GFOGER al medio existen muy pocas células positivas a fosfatasa alcalina. En contraste se observó un incremento considerable de células con actividad de fosfatasa alcalina en la condición DMEM/AA/DX/GFOGER. En el caso del control que sólo tuvo medio DMEM se presentaron algunas células positivas, lo cual se puede deber a que la población de células estromales es una población heterogénea y posiblemente existe la presencia de osteoblastos ya diferenciados. En

todo caso el número de células con actividad de fosfatasa alcalina es mucho mayor en las condiciones en las que se posee ácido ascórbico, dexametasona y GFOGER. Por otra lado, comparando el medio condicionado con ácido ascórbico y dexametasona sin GFOGER, existen células positivas para fosfatasa alcalina, lo cual es comprensible porque es un medio de diferenciación, pero otra vez el medio adicionado con GFOGER mostró mayor número de células positivas para fosfatasa alcalina.

Expresión de la calcificación en células estromales de médula ósea en cultivo.

En cultivos de células estromales de médula ósea con diferentes condiciones, se realizó la técnica de tinción con rojo de alizarina para detectar calcificación en las células (**Figura 6**). Es necesario indicar que a estos medios de cultivo se les adicionó b-glicerolfosfato. Se demostró que hay una mayor intensidad y más células teñidas de rojo, en la condición que tenía DMEM/AA/DX/GFOGER lo cual indica una mayor calcificación.

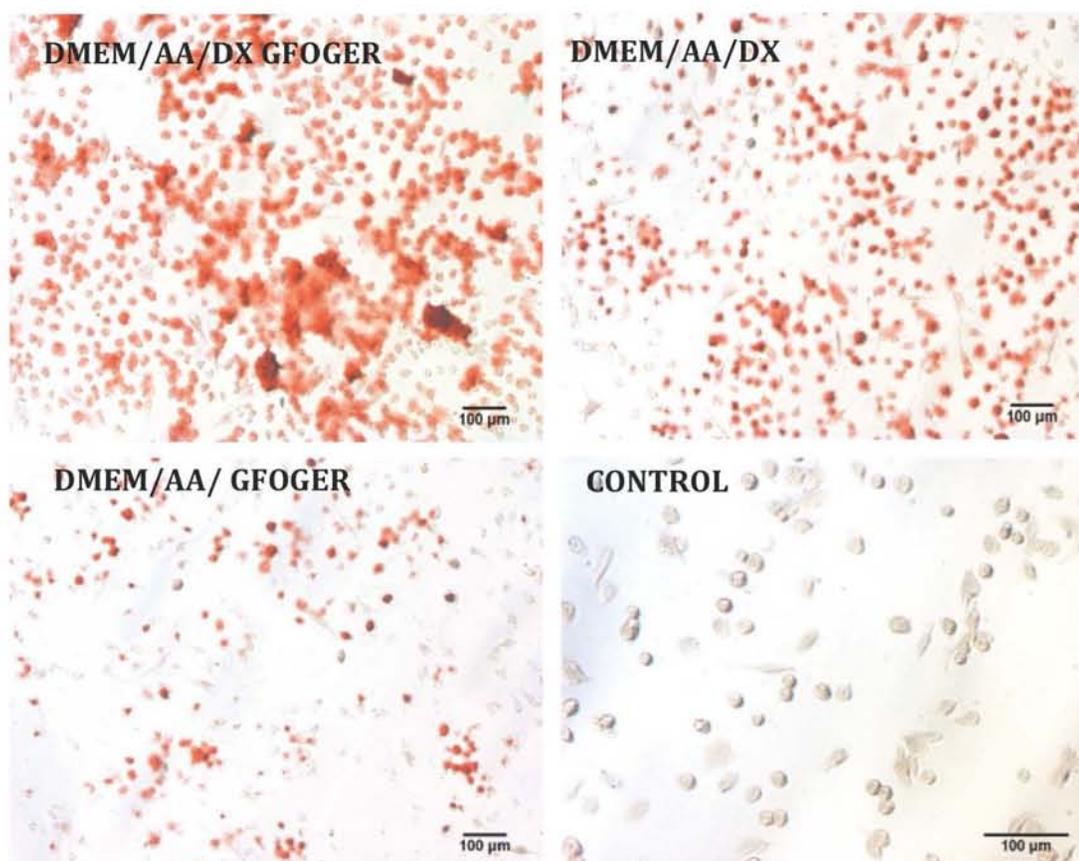


Figura 6. BMSCs en medio de cultivo al que se le adicionó b-glicerolfosfato (24 días de cultivo). Bajo diferentes condiciones de cultivo. Se observa que en la condición de DMEM/AA/DX/GFOGER el número de células es mayor y con más coloración.

Andamios con células estromales de médula ósea:

En este grupo de experimentos se probaron diferentes andamios con el propósito de analizar el efecto del GFOGER sobre ellos. En este sentido, se utilizaron andamios de b-fosfato tricálcico, de colágena y de fibrina, contruidos de la manera ya descrita, sobre los cuales las células estromales de médula ósea se sembraron y se analizaron a los 14 y a los 24 días de cultivo mediante microscopia electrónica de barrido y con cortes histológicos teñidos con diferentes técnicas.

Los andamios de fibrina en los cuales se colocaron células estromales de médula ósea resultaron en matrices estables que permitieron que las células se establecieran profundamente colocadas entre las fibras de fibrina. Además se observaron estrechos contactos entre las células y los fibras de fibrina lo cual indicó que las células estaban firmemente adheridas con el andamio circundante(**figura 7**). Por otro lado, se observaron numerosas células que se encontraban presentes en la superficie sin importar el día de cultivo (14 ó 24 días) .

Cuando se compararon los andamios de fibrina con los de colágena y de b-fosfato tricálcico se observó que en los dos últimos había pocas células implantadas y que en particular en los de colágena sólo se encontraban localizados en la superficie del andamio (**figura 8**). En el caso de los andamios de b-fosfato tricálcico sólo se observaron células a los 14 días, mientras que a los 24 días de cultivo carecían de ellas, posiblemente porque las células se despegaron del andamio (**figura 9**).

En los casos en los que se observaron células, como en los andamios de fibrina y de colágena las células se observaron con viabilidad por el aspecto morfológico. De hecho la gran mayoría de las células tenía un aspecto redondeado con pocas prolongaciones, lo cual concuerda con las observaciones de osteoblastos en el hueso.

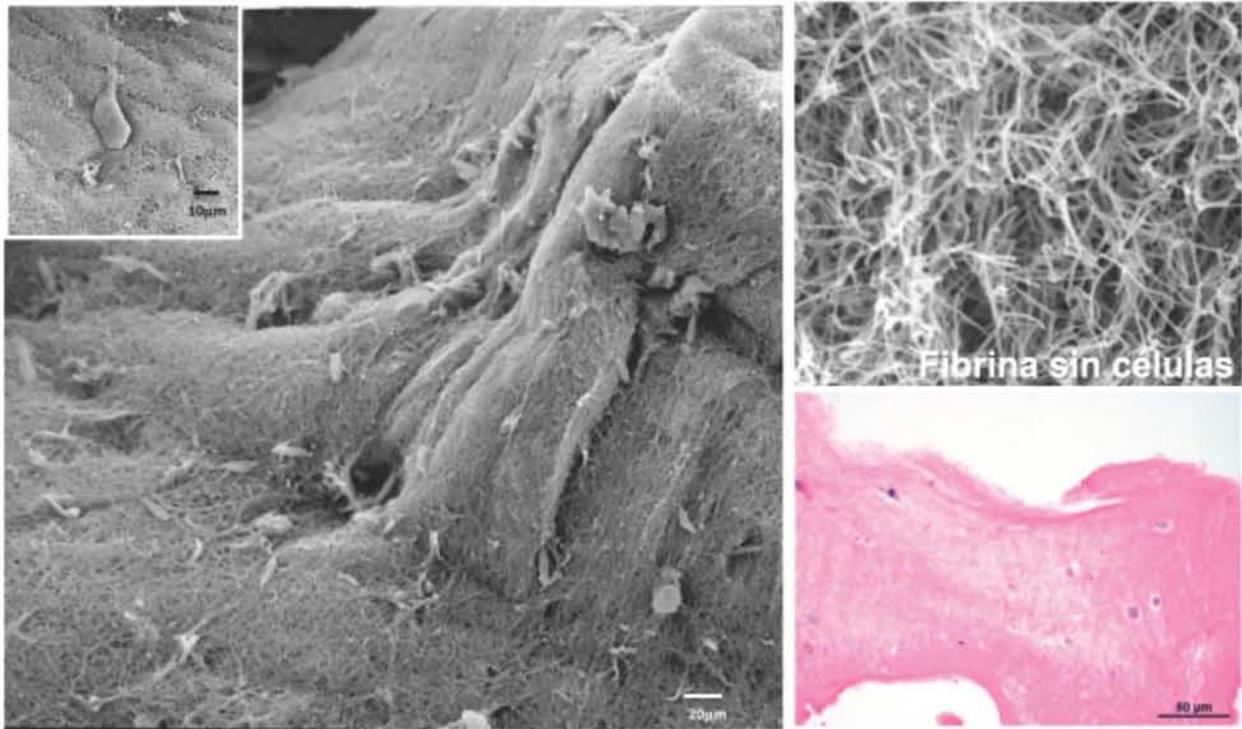


Figura 7. Células estromales de médula ósea diferenciadas a osteoblastos en un andamio de fibrina. Con microscopía de barrido se pueden observar células (a y b) de aspecto redondeado con pocas prolongaciones distribuidas entre las fibras de fibrina a la cual están firmemente adheridas. En c se muestra un andamio en el que no se colocaron células. En d se puede observar un corte histológico en el que se localizan células de aspecto redondeado que recuerdan el aspecto que posee el tejido óseo en un corte realizado de manera similar (H-E)

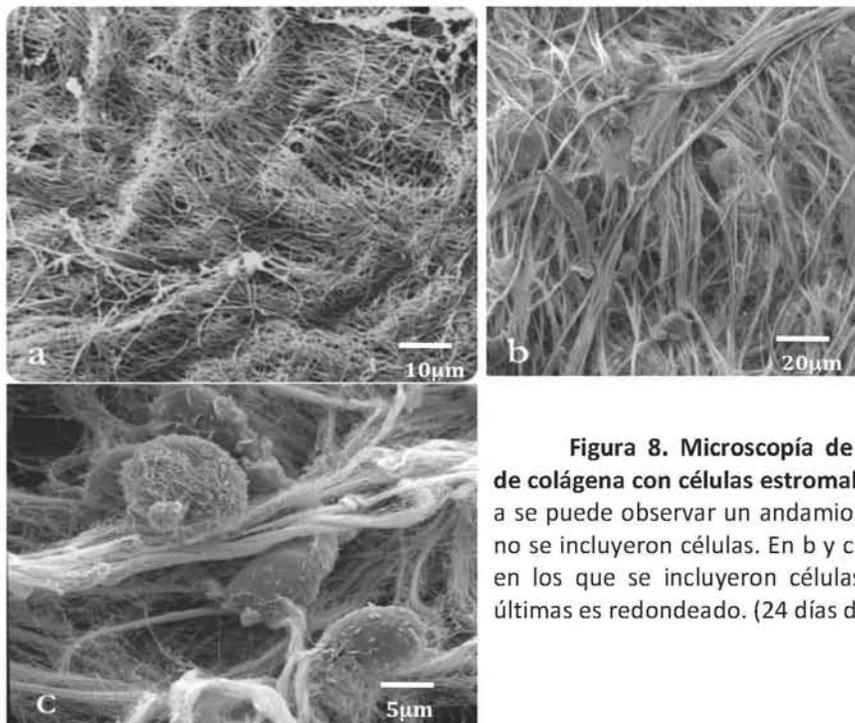


Figura 8. Microscopía de barrido de andamios de colágena con células estromales de médula ósea. En a se puede observar un andamio de colágena en el que no se incluyeron células. En b y c se observan andamios en los que se incluyeron células. El aspecto de estas últimas es redondeado. (24 días de cultivo).

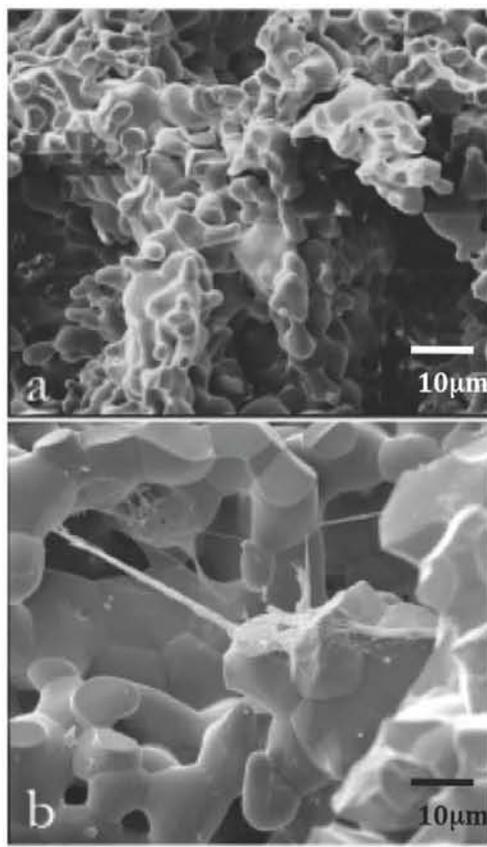


Figura 9. Microscopia electrónica de barrido de andamios de b-fosfato tricálcico con células estromales de médula ósea. En a, se puede observar el andamio de b-fosfato tricálcico sin células. En contraste en b y c se observan células adheridas laxamente a este andamio (14 días de cultivo). A los 24 días no se observaron células en este tipo de andamio.

Es de notar que a partir del día 14 de cultivo en los andamios de fibrina y de colágena, las células estromales de médula ósea cambiaron su aspecto alargado, parecido al que poseen los fibroblastos, a una forma redondeada, rodeadas de matriz parecida a la ósea y como si las células estuvieran ocupando el espacios que en el hueso se les conoce como lagunas. Este aspecto recuerda mucho al de los osteoblastos (**figura 10 a y b**). Este cambio fue mucho más notable en las células incluidas en el andamio de fibrina que en el de colágena (**figura 10 c y d**).

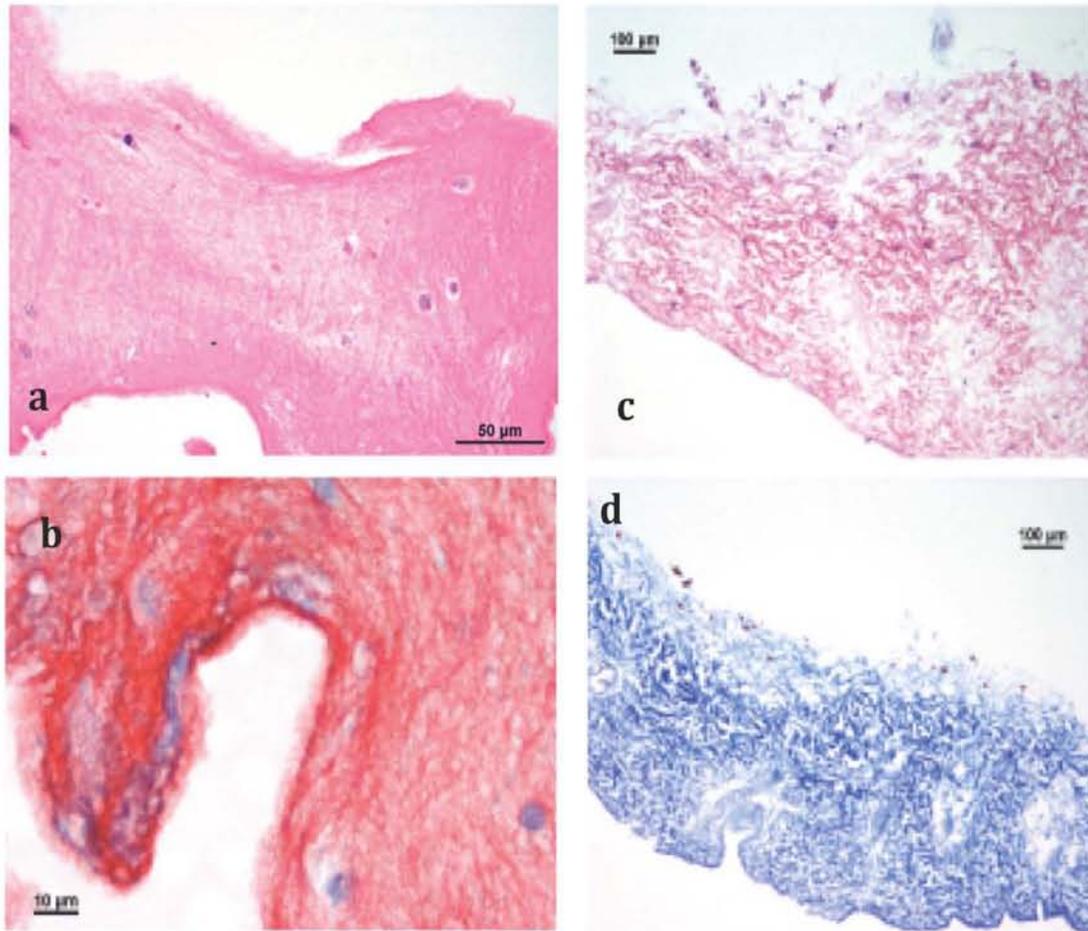


Figura 10. Células estromales incluidas en andamios de fibrina y colágena. En a y b se pueden observar células de aspecto redondeado en andamios de fibrina. En c y d se observan escasas células en el interior del andamio de colágena, observándose en mayor densidad en la superficie. a y c = H-E; b y d = Tricrómico de Masson).

El número de células redondeadas y con aspecto alargado se contaron en la matriz de fibrina en diferentes condiciones de cultivo. Se consideró como una célula alargada la que tuviera una o más prolongaciones. Los datos se encuentran graficados en la **figura 11**.

Evaluación de células redondas en andamio de fibrina

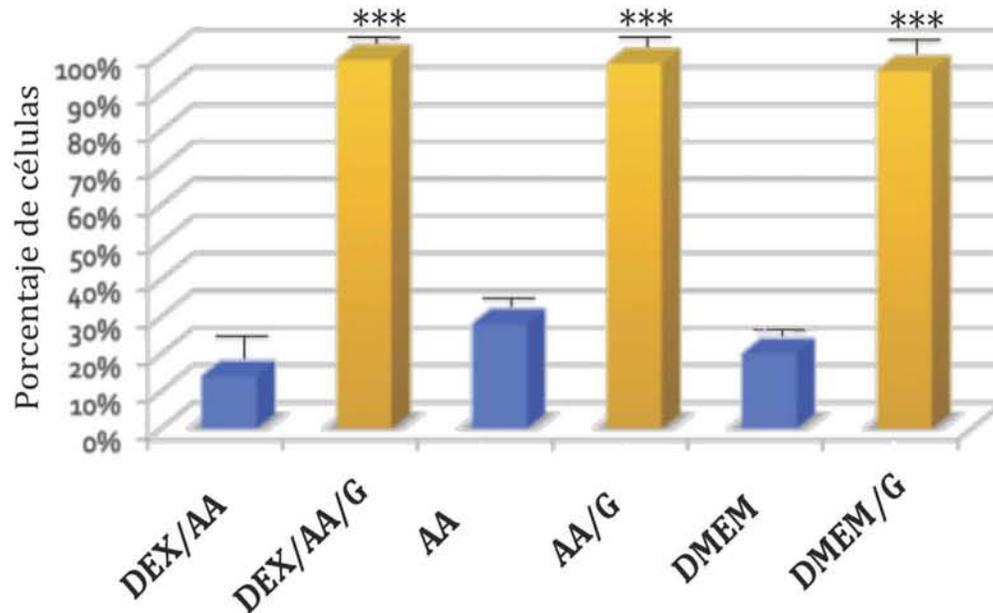


Figura 11. Gráfica de porcentaje de células redondas en andamio de fibrina. Se puede observar que en todos los casos en los que se adicionó la proteína GFOGER al medio de cultivo las células tuvieron un aspecto más redondeado que en las condiciones en que se cultivaron en el andamio de fibrina sin el péptido GFOGER. (24 días de cultivo)(AA: ácido ascórbico; Dex: Dexametasona; DMEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco; G: Con GFOGER). $p < 0.05$

Se puede apreciar que los valores de células redondeadas estuvieron por encima del 90% en todos los casos en donde las BMSCs fueron cultivadas en presencia de GFOGER. En contraste el porcentaje de células redondeadas fue menor al 30% en los casos de BMSCs cultivadas en ausencia de GFOGER.

Así, las diferentes condiciones de cultivo (con Dexametasona más ácido ascórbico, ácido ascórbico y medio de cultivo (DMEM)) no tuvieron influencia en la redondez de las células. Sin embargo, la adición del péptido GFOGER tuvo un efecto importante sobre la morfología de las BMSCs tanto a 14 días de cultivo como a 24 días (**figuras 12 y 13**). En todos los casos donde estuvo presente GFOGER las células incluidas en la matriz de fibrina mostraron un aspecto redondeado y muy pocas células mostraron un aspecto alargado parecido a fibroblastos. Este hecho, sugiere un efecto inductor del GFOGER para la transformación de las BMSCs en

osteoblastos. En la **figura 12** se pueden observar las diferentes condiciones de cultivo de BMSCs sobre una matriz de fibrina con o sin GFOGER a los 14 días de cultivo.

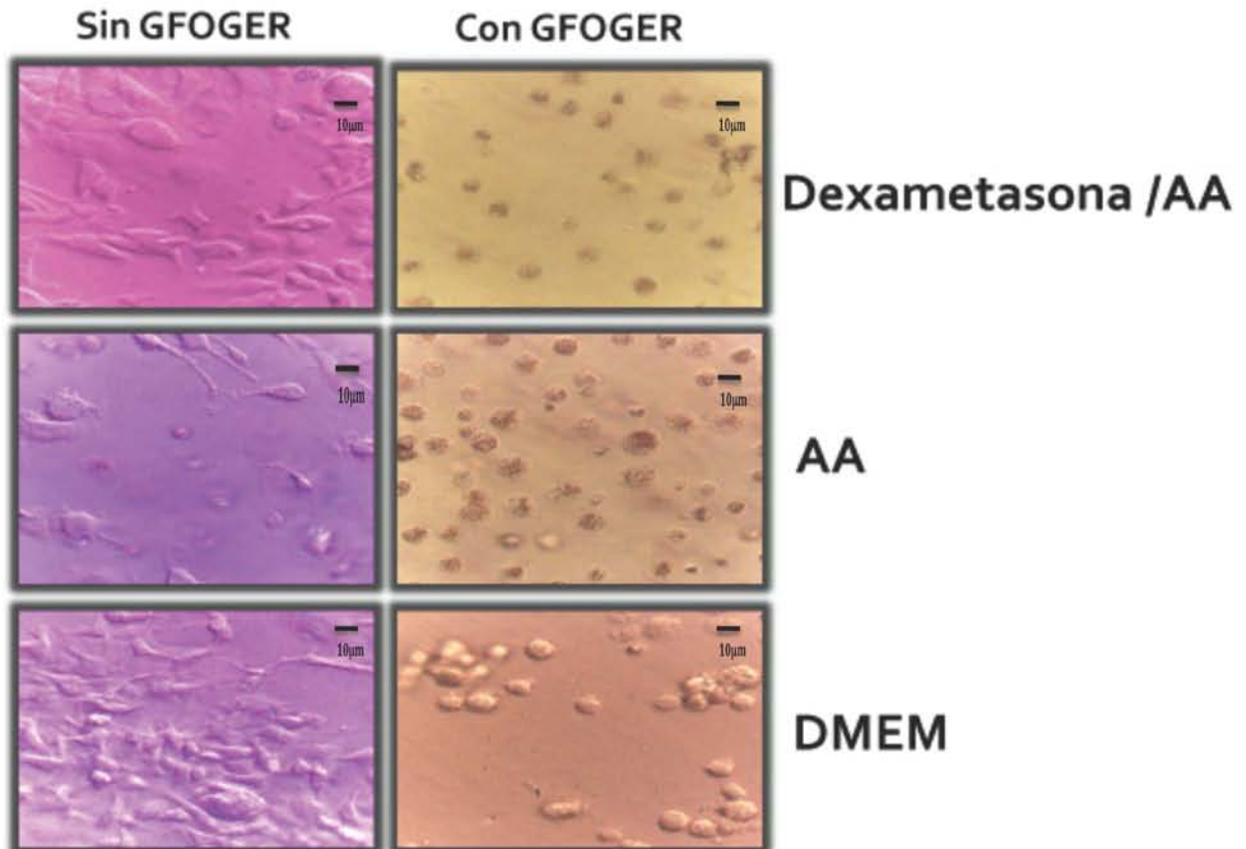


Figura 12. Cultivos de células estromales de médula ósea en un andamio de fibrina con GFOGER y sin GFOGER. Claramente se observa que en las condiciones en las que se le adicionó la proteína GFOGER al medio de cultivo el aspecto de las células tendió a ser redondeada. 14 días de cultivo. Fotomicrografía realizada con técnica de Relief (contraste modulado de Hoffman, Olympus) con un microscopio invertido, 40X. AA: ácido ascórbico; DMEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco.

El aspecto redondo se conserva a los 24 días y es de notar que no hubo cambios en el aspecto morfológico de las células cultivadas en andamio de fibrina con el péptido GFOGER, a pesar de que el medio contuviera dexametasona o no (**figura 13**).

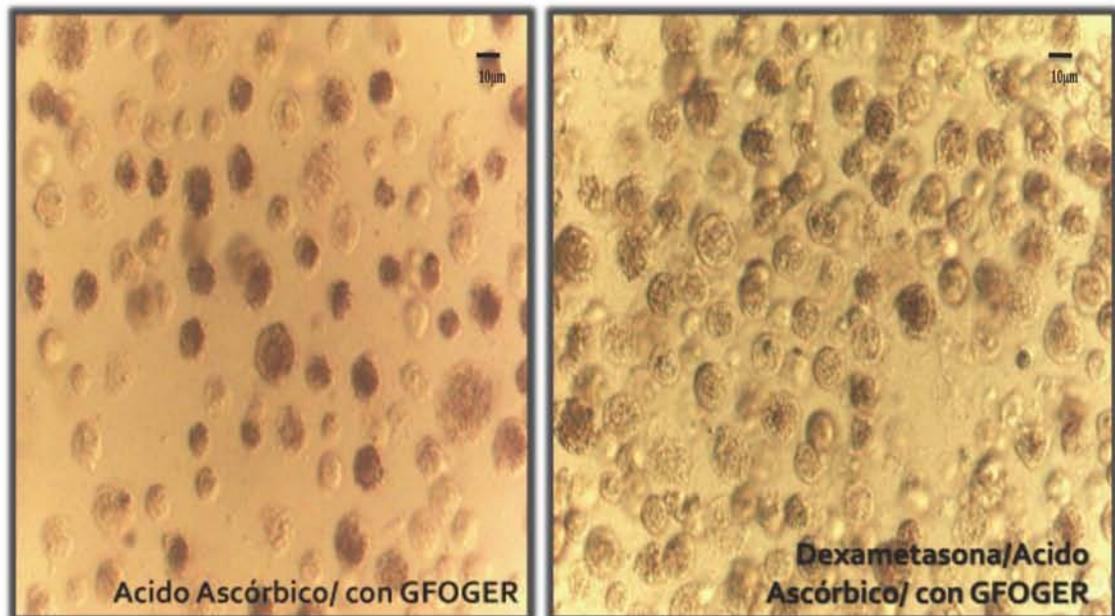


Figura 13. Andamios de fibrina con células estromales de médula ósea con GFOGER, 24 días de cultivo. En ambas figuras se puede apreciar el gran aspecto redondeado que se conserva hasta el día 24 de cultivo a pesar de que contiene dexametasona el cultivo de la figura de la derecha.

Diferenciación y evaluación de la actividad de osteoblastos a partir de células estromales de médula ósea.

La diferenciación de los osteoblastos se comprobó mediante la expresión de osteopontina, que es un marcador temprano de diferenciación a osteoblastos. La osteopontina es una fosfoproteína capaz de unirse al calcio, ya que tiene una elevada afinidad hacia la hidroxiapatita y juega un papel importante en la mineralización del hueso.

Cuando se realizaron ensayos por citometría de flujo para evaluar la expresión de osteopontina en las células estromales de médula ósea que fueron cultivadas en la matriz de fibrina se observó que en todos los casos las células fueron positivas. Sin embargo, en las matriz de fibrina con DMEM/AA/DX/GFOGER la expresión de las células osteopontina positivas fue mayor y fue significativa con respecto al control (**figura 14a**). Por otro lado, en la misma gráfica se muestra que DMEM/AA/DX/GFOGER muestra significancia con respecto DMEM/AA/DX. También se puede observar una fotomicrografía de la

inmunohistoquímica contra OPN del grupo DMEM/AA/DX/GFOGER tanto en el andamio de fibrina (**figura 14b**) como en células cultivadas sobre la caja petril (**figura 14c**).

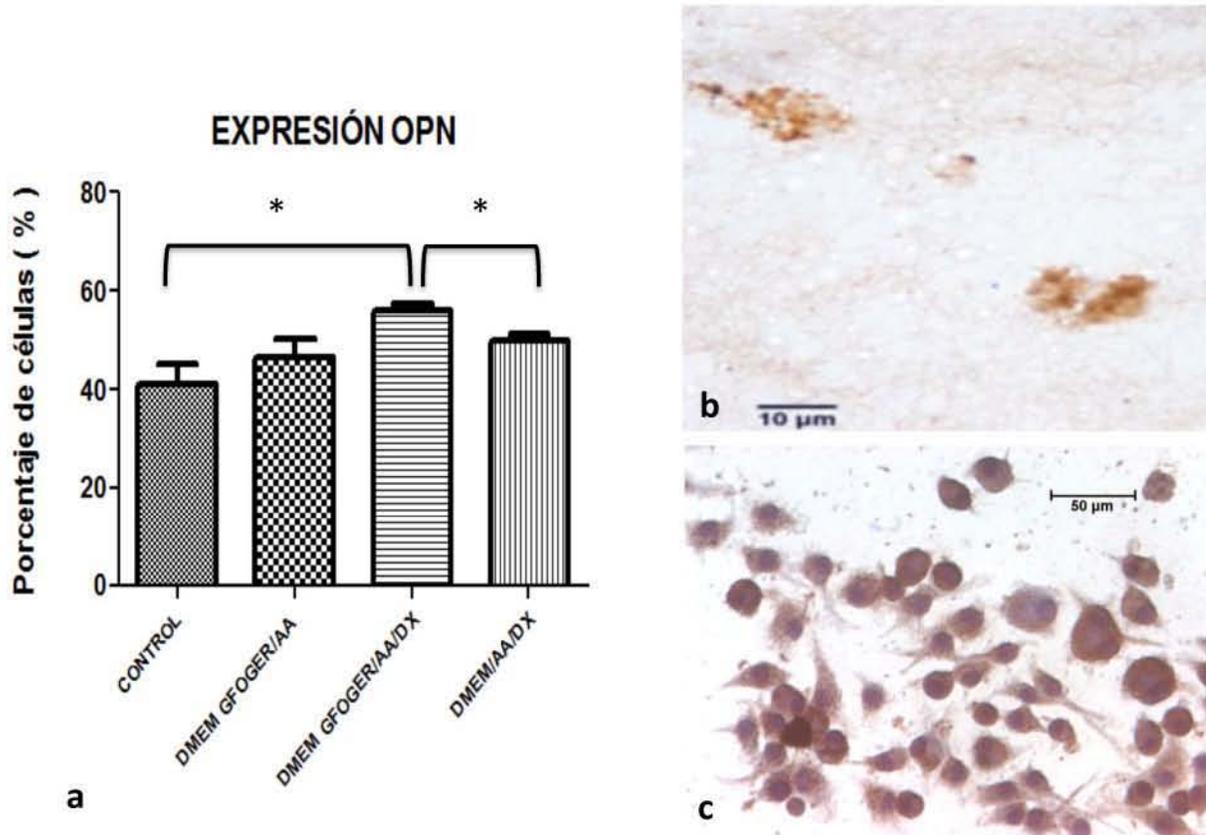


Figura 14. Expresión de osteopontina en células estromales de médula ósea (24 días de cultivo). Se puede observar que hubo diferencia significativa entre DMEM GFOGER/AA/DX & el control y DMEM GFOGER/AA/DX & DMEM/AA/DX $p < 0.05$ (a). En b y c se observa una fotomicrografía de inmunohistoquímica contra OPN, las marcas cafés indican la positividad de las células. (b) BMSCs cultivadas en andamio de fibrina y (c) BMSCs cultivadas sobre caja petril. (AA: ácido ascórbico; DX: Dexametasona; DMEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco)

Se decidió evaluar procolágena I como un marcador de actividad celular para demostrar que las células incluidas en los andamios están viables y funcionales.

Por lo que se evaluó la expresión de procolágena tipo I mediante citometría de flujo en las células que fueron incluidas en andamios de fibrina con y sin GFOGER adicionado al medio de cultivo. Se observó que no hubo diferencia significativa en la expresión de procolágena I en las distintas condiciones de cultivo entre los 7 y los 24 días de cultivo (**figura 15a**). Pero al evaluar la

expresión de procolágena I entre las distintas condiciones experimentales a los 24 días se encontró que hubo diferencia significativa entre los grupos DMEM/AA/DX/GFOGER con respecto al control y DMEM/AA/DX/GFOGER & DMEM/AA/DX . $p < 0.05$ (figura 15b).

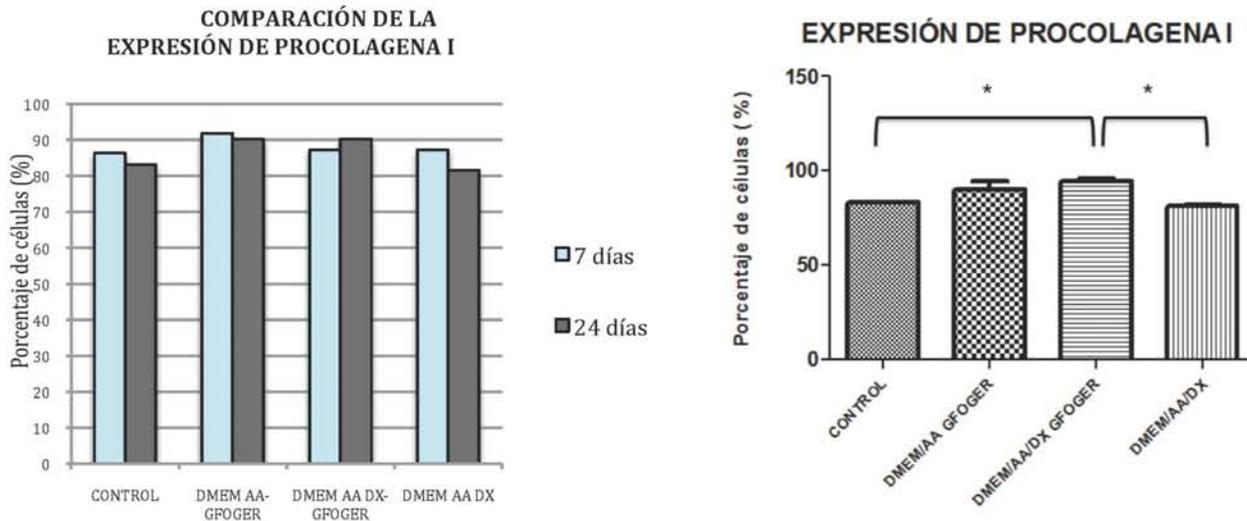


Figura 15. Expresión de procolágena I en células estromales de médula ósea cultivadas en andamios de fibrina y con diferentes condiciones de cultivo. (7 y 24 días). Es de notar que a los 7 y 24 días no hubo diferencia entre la expresión de procolágena I en los medios adicionados con y sin GFOGER(a). Sin embargo en b podemos observar que hay diferencia significativa entre DMEM/AA/DX/GFOGER & el control y DMEM/AA/DX. $p < 0.05$. (AA: ácido ascórbico; DX: Dexametasona; DMEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco)

Cuando se analizaron las células doble positivas para osteopontina y procolágena I se encontró que hay diferencia significativa entre las células doble positivas que fueron cultivadas en DMEM/AA/DX/GFOGER y DMEM/AA/DX (figura 16). También hubo diferencia significativa en las células que fueron cultivadas con DMEM/AA/DX/GFOGER con respecto al control (figura 16). Se concluyó que las células BMSCs, se han diferenciado a osteoblastos en los grupos en los que se colocó GFOGER evaluando la expresión de OPN y procolagena I.

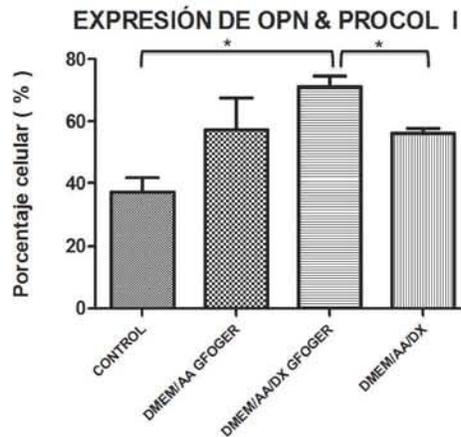


Figura 16. Coexpresión de osteopontina y procolágena I en células estromales de médula ósea cultivadas en andamios de fibrina con y sin GFOGER. a: DMEM/AA/DX/GFOGER y DMEM/AA/DX tuvieron diferencia significativa contra el control (0.03, Dunn); b: diferencia significativa (0.03 T-Student). (AA: ácido ascórbico; DX: Dexametasona; DMEM: Medio mínimo esencial de Dulbecco).

Calcificación

Se realizaron experimentos para detectar calcificación en los cultivos de BMSCs

En cada grupo se evaluó la precipitación de calcio por técnica de vonKossa (**figura 17**). La valoración de la calcificación fue realizada por medio de un observador externo el cual indicó por medio de cruces (+) la intensidad del depósito, siendo +++ la mayor, ++ la intermedia, + la menor y – la negatividad.

	Condición	GFOGER	Intensidad
1	DMEM /AA/DX	Si	+++
2	DMEM /AA	Si	+
3	DMEM /AA/DX	No	++
4	DMEM	No	-
CONTROL			

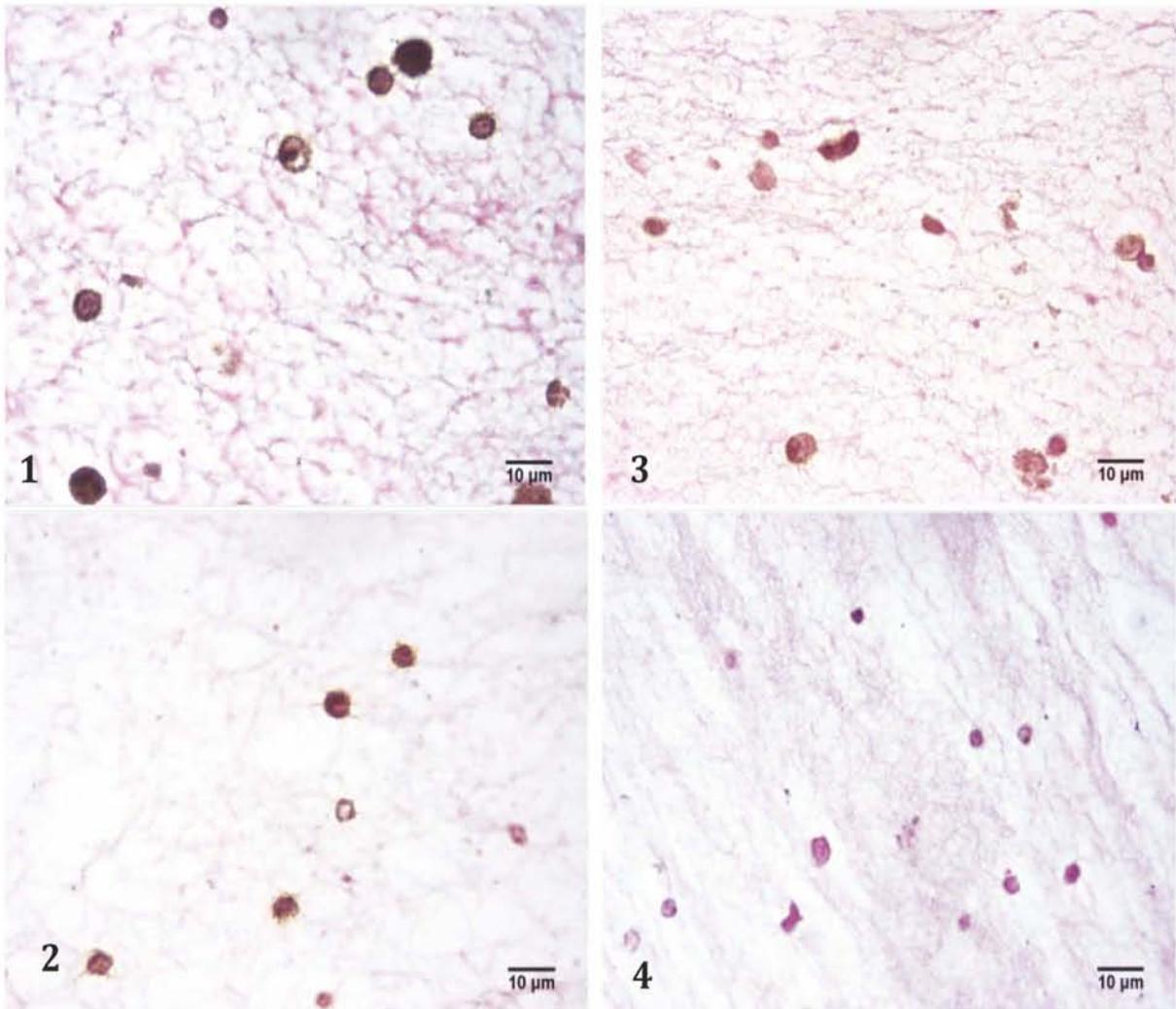


Figura 17. vonKossa. Se puede observar las células dentro del andamio de fibrina en una tonalidad café/negro en 1 y 2 en 3 se puede apreciar que la coloración café/negro es más tenue; mientras que en 4 las células se ven rosas.

Cuantificación de Ca⁺⁺ por dispersión de rayos X

El microanálisis de rayos X es una técnica cuantitativa basada en el análisis de elementos específicos en una muestra mediante rayos X generados por un haz de electrones en un microscopio electrónico de barrido. Esta técnica permite el análisis de más de un elemento al mismo tiempo en células individuales (Arrebola et al, 2005). Con el propósito de cuantificar la concentración de calcio en las diferentes condiciones de medio, se realizó un dispersión de rayos X en matriz de fibrina que estaba circundado a las células. En la **figura 18** se encuentra una gráfica donde se muestra los valores de Ca⁺⁺ en tres diferentes condiciones.

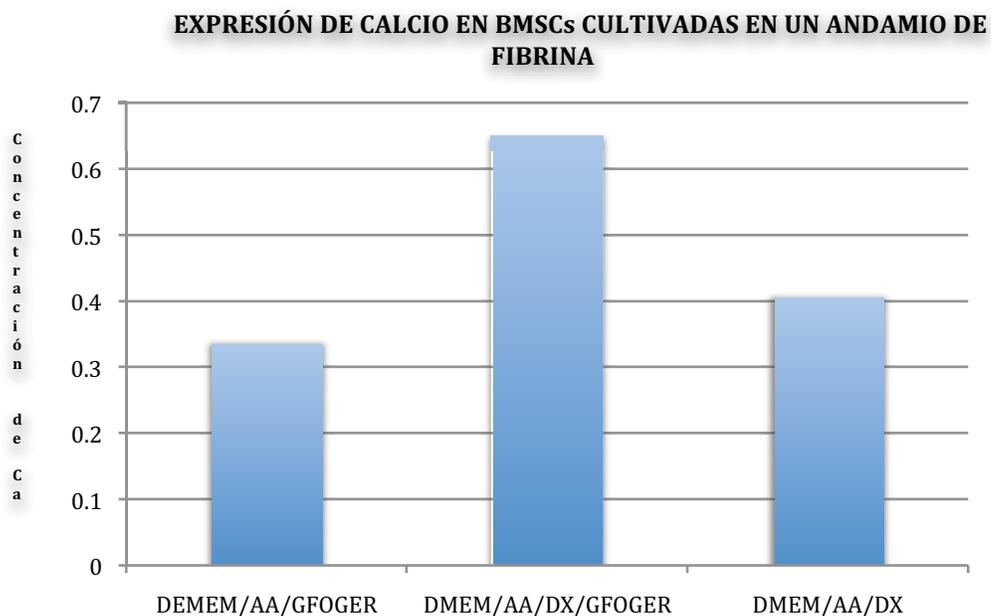


Figura 18. EDX. Muestra la concentración de calcio en andamios de fibrina a 24 días de cultivo en 3 distintas condiciones.

DISCUSIÓN

Los datos presentados en esta tesis demuestran que en presencia del péptido GFOGER, mimético de colágena I, se incrementa la proliferación, diferenciación y calcificación de osteoblastos derivados de células estromales de médula ósea que fueron o no incluidos en una matriz de fibrina.

En los últimos años se han buscado nuevas alternativas de tratamiento para reemplazar al tejido óseo afectado por patologías adquiridas o congénitas, tales como traumas, tumores o infecciones. En particular en odontología, con frecuencia se necesitan realizar procedimientos en los cuales la reparación ósea es indispensable con el propósito de restablecer la funcionalidad del aparato estomatognático. Así, en algunos casos, se realizan procedimientos de resección, o reconstrucción de hueso, haciéndose necesarios implantes de diferentes materiales biológicos y no biológicos (Itthichaisri C, et al, 2007). Los resultados del presente estudio aportan alternativas de tratamiento para estos fines.

Desde hace años se han utilizado cultivos de células estromales de médula ósea para obtener osteoblastos con resultados variables y no siempre reproducibles, debido a la gran heterogeneidad de las poblaciones contenidas en la médula ósea. Sin embargo, en los resultados obtenidos en esta tesis se consiguió obtener una población relativamente homogénea de células estromales (1.5×10^6) que de manera selectiva se diferencia a osteoblastos. Lo anterior se logró, de manera sencilla, mediante el cambio frecuente de medio de cultivo (Díaz L.M et al, 2007). Con esta metodología los experimentos fueron reproducibles y consistentes para la obtención de osteoblastos.

En ingeniería de tejidos no sólo se necesitan las células diferenciadas, sino que también se requiere de andamios que les proporcionen el soporte necesario para que puedan tener la prestancia morfológica y funcional para reparar o sustituir a los tejidos dañados. En este sentido se han utilizado diferentes líneas y células incluidas en andamios de policaprolactona (PCL), ácido L-poliláctico (PLLA), fibrina, colágena, b-fosfato tricálcico (b-TCP), hidroxiapatita (HA) y distintas mezclas de ellos con el propósito de optimizar la adhesión, diferenciación y viabilidad celular. Aunado a ello se han buscado péptidos que modulen el funcionamiento y

crecimiento celular. Razón por la cual se decidió investigar si el péptido GFOGER tiene esta capacidad.

En el presente trabajo, se utilizaron tres diferentes tipos de andamios a los que se les añadió GFOGER, donde se colocaron a las células estromales de médula ósea. La adherencia e integración de las células en los andamios fue diferente en los tres casos. Con respecto a las células que fueron colocadas en los andamios de b-TCP no se observó una buena adherencia, aun en la presencia del péptido GFOGER. Es de notar que sólo se observaron escasas células adheridas laxamente a los 14 días de cultivo, mientras que a los 24 días de cultivo no se observaron (fig. 9) Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Hennessy K et al (2009) en los que utilizaron andamios de HA cubierto con GFOGER donde observaron una escasa adherencia celular. Probablemente, en nuestro caso la falta de adhesión celular en los andamios de b-TCP se deba a dos situaciones: 1) que este biomaterial absorbió muy poco al péptido GFOGER y, 2) la rápida desintegración del biomaterial en el medio de cultivo. Con respecto a éste último punto, se ha clasificado al b-TCP como un material biodegradable lo cual corroboramos ya que en varios de los experimentos el tamaño de las partículas de este material se iban haciendo más pequeñas conforme avanzaban los días de cultivo. Por otro lado, es necesario considerar que la cubierta de GFOGER sobre el andamio de b-TCP fue realizada de manera pasiva y sólo durante algunos minutos. En contraste, Dobler D et al (2004) realizaron las cubiertas de GOFER en andamios de titanio y de HA durante toda la noche a 37 °C obteniendo resultados aceptables.

Con respecto a los andamios contruidos con una base de colágena y cubiertos con GFOGER en los cuales se colocaron BMSCs se observó que había células adheridas a los 14 y 24 días de cultivo, sin embargo estuvieron localizadas exclusivamente en la superficie del andamio (figs 8, 10c,d). Esta observación sugiere que la consistencia y grosor de las fibras del andamio de colágena, que fue obtenido de dermis desvitalizada de ratón, no es la adecuada para permitir la penetración de las BMSCs en ellos y su posterior diferenciación hacia osteoblastos. Es posible que si se preparan andamios de colágena de otra manera haría posible que las células migraran con mayor facilidad.

Con relación al andamio de fibrina en el cual se disolvió el péptido GFOGER, las BMSCs se distribuyeron de manera homogénea en todo el andamio y se observaron fuertemente integradas al mismo (figuras 7, 10a y b, 12 y 13). Estos andamios demostraron que pueden soportar el crecimiento y diferenciación de células, además de ser biocompatibles y de bajo costo, por lo que se eligió este andamio para diferenciar a las BMSCs a osteoblastos en los experimentos de este trabajo.

La fibrina se ha usado como andamio, en el cual se han colocado diferentes tipos celulares, entre ellos cultivos de condroblastos para regeneración de cartílago. Estos andamios ha sido construidos tomando como base una solución concentrada de fibrinógeno y trombina (*Tisseel*[®], Bexter Inc., Corea) (Kim SJ et al, 2009), o andamios mixtos de fibrina con ácido poliláctico-glicólico (Munirah S et al 2008). Ambos andamios han permitido el crecimiento celular y recuerdan morfológicamente al cartílago. También se han cultivado BMSCs en andamios de fibrina con diferentes concentraciones de fibrinógeno en los cuales la proliferación celular y la diferenciación hacia osteoblastos se demostró en concentraciones de fibrinógeno de 1.5 a 3%, pero no en las que tenían un andamio con una concentración de 6% de fibrinógeno (Trombi L et al, 2008). Es necesario hacer notar que la concentración de fibrinógeno inicial antes de ser disuelta en porcentaje era de un rango de 40 a 78 mg/mL. En contraste con nuestro trabajo las concentraciones de fibrinógeno son del orden de 4 a 9 mg/mL, un orden evidentemente mucho menor, pero que permitió un adecuado crecimiento y diferenciación de las BMSCs hacia osteoblastos. Por otro lado, es de notar, por los datos de Trombi, que la concentración de fibrinógeno es determinante para el crecimiento celular, situación que es necesario tomar en cuenta para futuros experimentos y procedimientos para construir hueso con este tipo de andamios. Además, previo al proceso de polimerización del fibrinógeno, las células quedan incluidas dentro del andamio, permitiendo su distribución homogénea y posterior crecimiento y diferenciación. Por otro lado, también es necesario tomar en cuenta el costo de los andamios. En los estudios de Kim SJ et al (2009), Munirah S et al (2008) y Trombi L et al (2008) se utilizaron geles de fibrina de manufactura comercial lo cual necesariamente eleva el costo de fabricación de los constructos. En cambio nosotros utilizamos como fuente del

fibrinógeno plasma sanguíneo obtenido de bancos de sangre de algunos hospitales, lo cual disminuye el costo.

Otro factor que debe ser tomado en cuenta es la flexibilidad del andamio para la fabricación de los constructos. Así, si las células son colocadas en andamios flexibles que permitan la migración y establecimiento de contactos intercelulares permitirán un mejor diseño que se parezca al del tejido original. Por otro lado un material de esta naturaleza facilita el flujo de iones, nutrientes y de citocinas permitiendo que las células se adapten a las condiciones de cultivo y lleven a cabo su función. En este sentido, con objeto de modificar la flexibilidad de andamios cilíndricos de PCL se les añadió la molécula F127, que es un compuesto plurónico con propiedades de detergente de baja toxicidad, para reducir la viscosidad y proveer de hidrofiliidad al andamio. Al analizar la diferenciación observaron que la adherencia y el crecimiento celular dentro del andamio fue máxima a los 56 días (Oh SH. et al , 2006). Por otro lado, Mattii L et al (2008) utilizaron PLLA mezclada con gelatina de colágena de bovino, con lo cual mejoraron las propiedades del biomaterial con objeto de implantar células en él. Ellos observaron que el material era flexible y encontraron que una alta adhesión de BMSCs por el andamio, además de una adecuada proliferación y diferenciación hacia osteoblastos. Con respecto a nuestros resultados, los andamios de fibrina han demostrado una gran flexibilidad y además permiten el paso adecuado de nutrientes y citocinas. Así, en nuestro caso, la proliferación y diferenciación se logró de manera satisfactoria, incluso a menor tiempo que el reportado por Oh SH. Et al, (2006), donde observaron una diferenciación de BMSCs a los 56 días, mientras que nosotros lo observamos a los 24 días. De esta manera, consideramos que los andamios de fibrina son los mejores para el proceso de crecimiento y diferenciación de BMSCs hacia osteoblastos.

Una condición fundamental para fabricar constructos óseos es la proliferación de las células a diferenciarse, la cual depende de las condiciones del cultivo. Así, nosotros observamos que las BMSCs proliferan significativamente en presencia de SFB al 10% y cuando se cultivan con SFB al 2% no lo hacen, demostrado mediante la expresión del antígeno Ki-67 por citometría de flujo. Cuando al medio de cultivo se le añadió el péptido GFOGER, en aquellos que tenían SFB al 10% la proliferación se incrementó y se encontro significancia, sin embargo, los cultivos con SFB

al 2% permanecieron sin cambio, aún con la adición del péptido GFOGER (figs. 3 y 4). Lo anterior quizás se deba a que las condiciones de cultivo no son las óptimas ni semejan las concentraciones de nutrimentos en las que están las células *in vivo*. Nuestros resultados son similares a los de los experimentos realizados por Reyes K et al (2003, 2004 y 2007) y Popova S et al (2007) donde las condiciones de cultivo fueron semejantes y donde el péptido GFOGER incrementó el índice de proliferación de BMSCs.

El péptido GFOGER, como ya se comentó, es un péptido mimético de la colágena que se une a proteínas transmembranales específicas llamadas integrinas, de manera concreta a las $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ y $\alpha 11\beta 1$. Estas integrinas *in vivo* se unen a proteínas de matriz extracelular, como la colágena, con las cuales interaccionan proveyendo las capacidades morfológicas y funcionales de las células. Por ejemplo, se sabe que los osteocitos responden a estímulos que causan tensión en el hueso, a través de su unión con colágena, liberando monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), osteocalcina y factor de crecimiento similar a insulina. La liberación de estos factores facilita la incorporación de preosteoblastos que favorecen el remodelamiento del esqueleto (con la adición de más hueso). De manera similar, se ha demostrado que el péptido GFOGER, al unirse a las integrinas de membrana de las BMSCs, induce un efecto de proliferación y diferenciación (Reyes C, et al. 2003, 2004 y 2007; Popova S, et al 2007). Nuestros resultados concuerdan con estos datos.

Por otro lado, es necesario comentar con relación a la diferenciación celular es importante que el medio osteoinductor incluye ácido ascórbico 2- fosfato, b-glicerol fosfato, dexametasona y concentraciones apropiadas de 1,25-dihidroxi vitamina D3 con el objeto de desarrollar el fenotipo osteoblástico (Heinemann C et al 2011). Sin embargo, Atala A et al (2002) ha observado que el b-glicerol fosfato no influye ni en la diferenciación ni en la proliferación celular. Debido a lo anterior nuestros experimentos de proliferación y diferenciación no incluyeron b-glicerol fosfato. Como marcadores de diferenciación de BMSCs a osteoblastos se emplearon osteopontina (OPN) y la demostración de actividad enzimática de fosfatasa alcalina; asimismo se consideró la síntesis de procolágena tipo I como marcador de actividad celular.

La osteopontina (OPN) es una proteína de adhesión extracelular que es muy abundante en el hueso y es sintetizada por preosteoblastos, osteoblastos y osteoclastos. En osteoblastos la

expresión de osteopontina es regulada por factores de diferenciación y crecimiento (Beck G et al 2000). Es de notar que esta proteína se expresa de manera temprana en células que se están diferenciando hacia osteoblastos. Cabe señalar que el GFOGER se une a los mismos receptores de integrinas, $\alpha_v\beta_1$ y $\alpha_4\beta_1$, para la activación de señales intracelulares que median la diferenciación celular a osteoblastos (Oldberg A et al, 1986; Smith JH et al, 1987; Patarca R et al, 1989; Denhardt DT, 1993; O'Regan AW et al 2000; Denhardt DT et al 2001). Nuestros resultados mostraron una mayor expresión de osteopontina en BMSCs a los 24 días de cultivo en presencia de GFOGER en el medio de cultivo. Esta expresión indicó que las BMSCs se habían diferenciado hacia osteoblastos, como ya se comentó con anterioridad. Ahora bien, este hallazgo es de notar porque entonces GFOGER debe ser considerado como un inductor de diferenciación de BMSCs hacia osteoblastos, tal y como lo sugiere Reyes C et al (2007). En contraste, la expresión de osteopontina en osteoblastos diferenciados de BMSCs en ausencia de GFOGER en los medios de cultivo es significativamente menor (Trombi, 2008). En este sentido, el proceso de diferenciación de osteoblastos para ser utilizados en medicina regenerativa se podría acelerar con la adición de GFOGER al medio de cultivo o cubriendo los andamios donde las células serán colocadas. Por ejemplo, en la actualidad los protocolos que utilizan elementos celulares para reparar fracturas óseas o procesos degenerativos óseos necesitan de aproximadamente 6 semanas de cultivo (Beauchamp RD, 2007). Con la adición de GFOGER dicho tiempo puede reducirse dependiendo del biomaterial utilizado y la concentración de GFOGER, situación que próximamente analizaremos.

Otro parámetro de importancia para identificar diferenciación celular osteoblástica es la expresión de fosfatasa alcalina ya que es un marcador temprano de diferenciación celular. La actividad de esta enzima se puede evidenciar partir de los 7 días de cultivo de células que se han diferenciado diferenciando en osteoblastos (Wang A et al 2010) Las fosfatasas se clasifican en ácida o alcalina y ambas catalizan la hidrólisis de monoésteres de fosfato dependiendo del pH, permitiendo que en la matriz orgánica ósea se precipiten sales de fosfato de calcio. Nuestros resultados mostraron la presencia de células positivas para fosfatasa alcalina, sin embargo, aquellos cultivos a los que se les añadió GFOGER tuvieron más células positivas (fig. 5). Es cierto que este dato es observacional ya que no se cuantificó el número de células positivas, pero es

evidente, como se ilustra en la figura 5, que son muchas más. Ahora bien, tomando esta observación junto con los datos de mayor expresión de osteopontina en células cultivadas en presencia de GFOGER, corrobora que el péptido GFOGER induce un incremento en la diferenciación hacia osteoblastos. De hecho, otros investigadores (Díaz LM et al 2007) han encontrado esta actividad enzimática en osteoblastos hasta los 23 días, lo cual favorece la idea de que es necesario utilizar el péptido GFOGER para optimizar la diferenciación de BMSCs hacia osteoblastos.

Para obtener resultados óptimos en medicina regenerativa, las células que se han de utilizar deben de tener las prestaciones funcionales adecuadas. Es así que en este trabajo se evaluó la síntesis de procolágena I como indicador de actividad celular. Esta molécula, precursora de la colágena, es escindida una vez que es secretada dando lugar a la tropocolágena la cual se ensambla para formar la molécula característica de la colágena (Terraz C et al 2001). En el presente trabajo se evaluó, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células que sintetizaban procolágena 1 en BMSCs a los 7 y 24 días en presencia o ausencia de GFOGER en el medio de cultivo. Los datos no mostraron diferencias entre los 7 y 24 días de cultivo en todas las condiciones, sin embargo dentro del grupo de 24 días, si hubo una mayor expresión de la procolágena 1 en aquellos cultivos celulares a los que se les había añadido GFOGER (fig. 15). Lo anterior sugiere que el péptido GFOGER incrementa la actividad celular medido esto por la síntesis de procolágena. En este sentido es necesario hacer dos consideraciones: 1) es necesario recordar que diferentes células pueden producir procolágena 1 y no sólo las de la línea osteoblástica y, 2) pudieran existir otros marcadores de actividad celular, además de la procolágena 1, que pudieran evidenciar otras funciones a ser evaluadas. Con respecto al primer punto demostramos que un 60 al 70% de células cultivadas en presencia de GFOGER en el medio de cultivo expresaron positividad para osteopontina y procolágena 1, indicando que la gran mayoría de las células eran osteoblastos. Con respecto al segundo punto, otro indicador importante de funcionalidad es la capacidad de división celular, condición que quedo demostrada en los experimentos que se realizaron para evidenciar la expresión del antígeno Ki-67. Así, tomando en conjunto la capacidades de síntesis de procolágena 1 y de división en las células cultivadas en presencia de GFOGER, sugiere que las condiciones de cultivo celular

desarrolladas por nosotros fueron favorables para la actividad celular y podrían ser utilizadas en medicina regenerativa.

Con relación a la calcificación de la matriz extracelular, este es un fenómeno que se lleva a cabo normalmente en el tejido óseo, por ello en el presente trabajo se decidió también evaluar este proceso mediante dos técnicas, la de von Kossa y la de rojo de Alizarina en cortes histológicos y cultivos, respectivamente (Trombi L et al (2008)).

La técnica de von Kossa es involucra una reacción en la que se precipitan iones de plata producto de la degradación fotolúminica de fosfato de plata. De esta manera estos iones de plata localizan los sitios donde hay sales fosfato de calcio. Es necesario indicar que esta técnica es altamente confiable y reproducible. Por otro lado, el colorante rojo de Alizarina (1,2-dihidroxi-antraquinona) se obtiene de raíces de plantas y es un compuesto orgánico, cuya fórmula es $C_{14}H_8O_4$. Este colorante se ha utilizado ampliamente para identificar calcio, coloreándolo de rojo. La técnica de von Kossa fue utilizada en cortes de constructos óseos de parafina y la técnica de rojo de Alizarina se empleó en cultivos de células. La razón de lo anterior se debió a la intención de corroborar los precipitados de calcio con dos tipos de técnicas diferentes y comprobar que efectivamente había estos depósitos de calcio. En los cortes histológicos de los andamios de fibrina que incluyeron BMSCs y que fueron teñidos con von Kossa se observó que, en cultivos de más de 24 días, aquellos a los que se les añadió el péptido GFOGER mostraron un mayor precipitado de calcio en contraste con aquellos a los que no se les había añadido GFOGER al constructo (fig. 17). Con relación a los cultivos celulares incubados con y sin GFOGER, la tinción de rojo de Alizarina mostró el mismo resultado que en los andamios (fig 6). Estos datos sugieren que en las condiciones de cultivo, tanto en andamios de fibrina como en cultivo celular, se indujo calcificación. Es necesario hacer notar que la valoración de la calcificación fue realizada por medio de un observador externo el cual indicó por medio de cruces (+) la intensidad del depósito, por ello en se ha considerado realizar un análisis a través de citometría estática mediante un software de análisis de imágenes. Por otro lado, también se realizó un microanálisis mediante energía de dispersión de rayos X. En este análisis, que sólo se realizó uno, se confirmó un aumento de presencia de calcio en un constructo de fibrina al que se le añadió GFOGER. Esta prueba es la más poderosa herramienta disponible en la actualidad

para cuantificar la composición de elementos totales, haciendo posible la determinación simultánea de Ca, P, Mg, K, Na y Cl a nivel celular. Es necesario realizar más ensayos con esta técnica para verificar su significado en nuestro modelo de constructos óseos.

CONCLUSIONES

Las BMSCs se han diferenciado en osteoblastos tanto en los andamios de fibrina como en cultivo celular, debido a:

- La forma celular
- Al proceso de calcificación
- Expresión de fosfatasa alcalina
- Expresión de osteopontina & procolagena I

Esta diferenciación está incrementada en las BMSCs/Dx/AA tanto en andamios de fibrina como en cultivo celular en presencia de GFOGER.

Esta situación puede deberse a la estimulación del GFOGER al unirse a sus receptores.

Anexo

Medio de Expansión

- DMEM 90ml
- SFB 10ml
- Ab (estreptomicina, penicilina y anfotericina Beta) 1ml

Medio de diferenciación a osteoblastos

- DMEM 90ml
- SFB 10ml
- Ab 1ml
- Acido Ascorbico 50microgramos/ml o 0.005g
- Dexametasona 10nM o 13 microlitros de sol 1:100

Solución para cosecha

- PBS 100 ml
- Tripsina 0.05%
- EDTA 0.02%

Despegar células estromales.

Verseno

- Tris base 3.04 gr.
- Cloruro de sodio 8 gr.
- Cloruro de potasio 0.4 gr.
- EDTA 0.2 gr.
- Agua destilada 1L.

Solución de tripsina al 0.4 % con Verseno en una proporción 1: 5 durante 10 min.

Fibrina

- Cloruro de Sodio 0.9%
- Citrato de Sodio 0.1%
- Cloruro de Calcio 1%
- Ac. Tranexámico 100 mg por mililitro.

HBSS (Solución Salina Balanceada de Hanks)

- Cloruro de Potasio 0.4 g
- Fosfato de Potasio mono básico 0.06 g.
- Cloruro de Sodio 8 g.
- Bicarbonato de Sodio 0.35 g
- Fosfato de Sodio dibásico 0.048 g
- Glucosa 1 g
- Agua 1L

Solución PBS (Amortiguador Salino de Fosfatos)

- Fosfato de Potasio 0.21g
- Fosfato de Sodio 0.726g
- Cloruro de Sodio 9g
- Agua destilada 1L

Fijador

- Formol 10%
- Buffer de lisis de eritrocitos
- Cloruro de Amoni 0.15M / 8.29g
 - Bicarbonato de Potasio 10mM /1g
 - EDTA 0.1mM / 0.037g

Rojo de Alizarina

- 1.- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- 2.- Incubar la solución de rojo de alizarina S al 2% pH 4.2 por 5 min.
- 3.- Examinar en el microscopio.
- 4.- No contrateñir.

Fosfatasa alcalina

- 1.- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- 2.- Preincubar toda la noche las muestras con cloruro de magnesio en un amortiguador de Tris Maleato 100mM (pH 9.2).
- 3.- Incubar por 2 horas a temperatura ambiente la solución de sustrato de fosfatasa alcalina (preparada con 100mM de tris maleato que contenga 0.2 mg/ml de naphthol AS-MX y 0.4 mg/ml de Fast Red TR).
- 4.- Lavar con agua destilada y contrateñir.

Solución de lisis de células rojas de sange para citometría de flujo

1. Cloruro de amonio 0.15M
2. Bicarbonato de poasio 10mM
3. EDTA 0.1nM
4. Agua destilada 1L

BIBLIOGRAFÍA

- Aden P, Paulsen R E. , Mæhlen J, Løberg E. M, Goverud L.I, Liestøl K, Lømo J. Glucocorticoids dexamethasone and hydrocortisone inhibit proliferation and accelerate maturation of chicken cerebellar granule neurons. *Brain Research* 1418 (2010) 32-41.
- Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein R.S, Manolagas S. C. Glucocorticoids and tumor necrosis factor (tnf) α increase oxidative stress and suppress wnt signaling in osteoblasts. *JBC Papers in Press*. Published on October 26, 2011 <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.283481>.
- Anitua Eduardo –López Gabriel, “Nueva técnica de regeneración ósea con una sustancia autóloga”, *Diario Médico*. <http://www.diariomedico.com/edicion/noticia/0,2458,87322,00.html>.
- Arrebola F, Zabiti S, Cañizares FJ, Cubero MA, Crespo PV, Fernández-Segura E. Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 204:500–507, 2005).
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res* 2009.
- Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, eds. *Sabiston Textbook of Surgery*. 18th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier;2007:chap 21 996–2011 themedicalbiochemistrypage.org, LLC | info @ themedicalbiochemistrypage.org. colagena
- Beck G R, Zerler B y Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *PNAS* Vol. 97 no. 15 2000.
- Bermúdez Meneses Priscilla (2003) *Medicamentos que alteran los procesos de coagulación*. Centro Nacional de información de medicamentos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Cancian DC, Hochuli-Vieira E, Marcantonio RA, Garcia Júnior IR. Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in *Cebus apella* monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 Jan-Feb;19(1):73-9.
- Carl E. Misch, “*Implantología contemporánea*”, 1995, Editorial Mosby Doyma Libros
- Chen, E. H. And Black, J. (1980): *J. Biomed. Mater. Res.* 14:567.
- Currie L J, Sharpe J R y Martin R The Use of Fibrin Glue in Skin Grafts and Tissue-Engineered Skin Replacements: A Review. *Plast. Reconstr. Surg.* 108: 1713, 2001
- Dengshun Miao and Andrew Scutt. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *The Journal of histochemistry & Cytochemistry* Vol. 50(3). 333-340, 2002.
- Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993;7: 1475–1482.

- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107:1055–1061.
- Derubeis Anna R and Cancedda Ranieri. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Annals of Biomedical Engineering*. Vol. 32. No. 1 2004 pp. 160-165.
- Dobler D, Ahmed N, Song L, Eboigbodin K and Thornalley P. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. *Diabetes* 55:1961-1969, 2006.
- Emsley J, Knight C, Farndale R and Barnes M. Structure of the integrin $\alpha 2\beta 1$ - binding collagen peptide. *J. Mol. Biol.* (2004) 335, 1019-1028.
- Emsley J, Knight C, Farndale R, Barnes M and Liddington R. Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha 2\beta 1$. *Cell* Vol. 101, 47-56, 2000.
- Ertan AB, Yilgor P, Bayyurt B, Calıkođlu AC, Kaspar C, Kk FN, Kose GT, Hasirci V. Effect of double growth factor release on cartilage tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Nov 14
- Eyricha D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, Staudenmaier R, Goepfericha A, y Blunk T. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 28 (2007) 55-65.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarron M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E47-51.
- Friedenstein AJ 1990 Osteogenic stem cells in the bone marrow. In *Bone and Mineral Research*, vol. 7, pp 243-272.
- Friedenstein AJ. Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer culture of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kiner* 1970:3: 393-403.
- Georgen F. Mushler, Cynthia Boehm and Kirk Easley. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volumen. *J Bone Joint Surg Am*. 1997:79: 1699-1709.
- Guerra Cobian O, Cruanas Hernández A, Martínez Castro E, Bermudo Cruz C. Estomatologa regenerativa de las células madres a la ingeniería tisular. Instituto Superior de Ciencias Medicas de la Habana. Facultad de Estomatología "Raúl González Sánchez" Dpto. de Cirugía. Cd. De la Habana, 2007.
- Guldberg RE, Duvall CL, Peister A, Oest ME, Lin ASP, Palmer AW y Levenston ME. 3D Imaging of tissue integration with porous biomaterials. *Biomaterials* 29 3757-3761,(2008).
- Halbhuber KJ, Krieg R, Geidel O, Dietz W. A modified Ce/Mg-BCIP-NBT formazan/indigoblue technique for demonstration of non-specific alkaline phosphatase activity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004;50 Online Pub:OL507-14.

- Heinemann C, Heinemann S, Worch H and Hanke T. Development of an osteoblast/osteoblast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. *European Cells and Materials* Vol. 21 2011(page 80-93).
- Hennessy K, Pollot B, Clem W, Phipps M, Sawyer A, Culpepper B and Bellis S. The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surface. *Biomaterial* 30 (2009) 1898-1909.
- Hoelzle DJ, Svientek SR, Alleyne AG, Wagoner Johnson AJ. Design and manufacture of combinatorial calcium phosphate bone scaffolds. *J Biomech Eng.* 2011 Oct;133(10):101001.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-5.
- Itthichaisri C, Wiedmann-Al-Ahmad M, Huebner U, Al-Ahmad A, Schoen R, Schmelzeisen R, Gellrich N.-C. Comparative in vitro study of the proliferation and growth of human osteoblast-like cells on various biomaterials. Published online 26 February 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.31191
- Jaiswal N, Haynesworth S, Caplan A and Bruder S. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cell in Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 64: 295-312 (1997).
- Kagami H, et al. Bone marrow stromal cells(bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: Basic science to clinical translation. *Int J Biochem Cell Biol* (2011), doi: 10.1016/j.biocel.2010.12.006.
- Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood N, Thomas R, Hards D, Quinn J, Niforas P, K. W. NG, Martin T and Billespie M. Localisation of RANKL (receptor Activator of NfκB Ligand) mRNA and Protein in skeletal and extraskelatal tissue. *Bone* Vol. 25 No. 5, 1999, 525-534.
- Kim KH.The Evolution of Urogenital Tissue Engineering.*Int Neurourol J.* 2011 Sep;15(3):107-108. Epub 2011 Sep 30.
- Kim SJ, Jang JD, Lee SK: Treatment of long tubular bone defecto f Rabbit using autologous cultured osteoblasts mixed with fibrin. *Cytotech* 2007, 54: 115-120.
- Klaus von der Mark, Park J, Bauer S, Schmuki P. Nanoscale engineering of biomimético surface: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* (2010) 339: 131-153.
- Knight C, Morton L, Peachey A, Tuckweel D, Farndale R and Barnes M. The collagen-binding A-domains of Integrin α1β1 y α2β1 recognize the same specific amino acid secuencia, GFOGER, in native (triple-helical)collagens. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 1 pp.35-40, 2000.
- Lachlan J. Currie, M.B.B.S., B.Sc., F.R.C.S., Justin R. Sharpe, B.Sc., Ph.D., and Robin Martin, B.Sc., Ph.D.The Use of Fibrin Glue in Skin Grafts and Tissue-Engineered Skin Replacements: A Review.*Plast. Reconstr. Surg.* 108: 1713, 2001

- Lin L, Ju S, Cen L, Zhang H, Hu Q. Fabrication of porous b-TCP scaffold by combination of rapid prototyping and freeze drying technology. Yi Peng, Xiaohong Weng (Eds.): APCMBE 2008, IFMBE Proceeding 19, pp. 88-91, 2008.
- Lina M. Díaz, Marien Villamil, Claudia L. Bernal, Martha L. Torres, M. Sc, Jamuna, K. Thevi, Fadzil A. Zakaria y José F. Mikán: Cultivo de células de linaje osteogénico de periostio de porcino para la evaluación de un biomaterial. *Revista Med* 15(2): 192-206,2007.
- Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, and Schlenke P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Howard a better understanding of their biology?. *Transfus Med Hemother* 2010; 37: 75-83.
- Lindroos Bettina, Aho K-L , Kuokkanen H, Ra" ty S, Huhtala H , Lemponen R , Yli-Harja O, Suuronen R y Miettinen S. Differential Gene Expression in Adipose Stem Cells Cultured in Allogeneic Human Serum Versus Fetal Bovine Serum. *VTISSUE ENGINEERING: Part A Volume 16, Number 7, 2010*
- Llames S G, Del Río M, Larcher F, Garcia E, García M, Escamez M J, Jorcano J L Holguín P y Meana. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Burns* 24 (1998) 621±630
- Maniatopoulos C, Sodek J and Melcher A.H. Bone formation in Vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* (1988) 254: 317-330.
- Manzanares M, Kiwon Choi C, Horwitz A. Integrins in cell migration- the actin connection. *J of Cell Science* 122, 199-206. (2009).
- Marek Mrozik K, Gronthos S, Menicanin D, Marino V y Bartold P. M. Effect of coating Straumann® Bone Ceramic with Emdogain on mesenchymal stromal cell hard tissue formation. *Clin Oral Invest* DOI 10.1007/s00784-011-0558-3
- Mattii L, Battolla B, D'Alessandro D, Trombi L, Pacini S, Grazia Cascone M, Lazzeri L, Bernardini N, Dolfi A, Galimberti S y Petrini M. Gelatin/PLLA Sponge-like scaffolds allow proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Macromol. Biosci.* 8, 819-826, 2008.
- Meana A, Iglesias J, Del Río M, Larcher F, Madrigal B, Fresno M.F, MArtín C, San Román F y Tevera F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Transplantation* Vol. 77, 350–355, No. 3, February
- Oh SH, Park IK, Kim JM y Lee JH *In Vitro* and *in vivo* characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* 28 1664- 1671 (2007).
- O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol Today* 2000: 21:475–478.
- Oi Yosei, Ota M, Yamamoto S, Shibukawa Y y Yamada S. β -tricalcium phosphate and basic fibroblast growth factor combination enhances periodontal regeneration in intrabony defects in dogs *Dental Materials Journal* 2009; 28(2): 162 - 169

- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg–Gly–Asp cell–binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:8819–8823.
- Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, et al. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta–1) gene. Definition of a novel T cell–dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 1989; 170:145–161.
- Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* Vol. 284 April 1999.
- Popova S, Lundgren-Akerlund E, Wiig H and Gullberg D. Physiology and pathology of collagn receptors review. *Acta Physiol* 2007, 190, 179-187.
- Pró E, Anatomía clínica, 1ª edición, Médica Panamericana 2012.
- Q. QU. M. Perala-Heape. A. Kapanen, J. Dahllund, J. Salo, H.K. Vaananen and P. Harkonen: Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in Mouse bone marrow culture. *Bone* Vol. 22, No. 3 1998:201-209.
- Qu Zhe, Andrukhov O, Laky M, Ulm C, Matejka M, Dard M y Rausch-Fan X, Effect of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of osteoblast cells grown on the titanium implant surface. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:517-522)
- Raynor J, Petrie T, Fears K, Latour R, García A and Collard D. Saccharide Polymer Brushes to control protein and cell adhesion to titanium. *Biomacromolecules* 2009, 10, 748-755.
- Reyes C, Petrie T, Burns K, Schwartz Z and García A. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue Ealing and integration. *Biomaterials* 28 (2007) 3228-3235.
- Reyes C. D, García A J. . Engineering integrin-specific surface with a triple-helical collagen-mimetic peptide. *J Biomed Mater Res* 65A: 511-523 2003.
- Reyes C.D. , García A J. . a2b1integrin-specific collagen-mimetic surface supporting osteoblastic differentiation. *J Biomed Mater Res* 69A: 591-600, 2004.
- Richard DJ, Kassem M, Hefferan T, Sarkar G, Spelsberg T, Riggs L: Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *Journal of bone& mineral research* 1996; 11(3): 312-24.
- Roni Kolerman, Haim Tal and Ofer Moses: Histomorphometric análisis of newly formed bone alter maxillary sinus floor augmentation using ground cortical bone allograft and internal collagen membrane. *J Periodontal* 2008;79:2104-2111.
- Rosa V, Botero TM, Nör JE. Regenerative endodontics in light of the stem cell paradigm. *Int Dent J.* 2011 Aug;61 Suppl 1:23-8.

- Ross M. y Pawlina W, *Histología Texto y atlas color con biología celular y molecular* 5ª edición, Médica Panamericana 2007.
- S Keila, A Kener and M Weinreb: Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity in vivo and in Vitro. *Journal of endocrinology* (2001) 168, 131-139.
- Sang-Soo Kim, Min Sun Park, Seung-Woo Cho, Sun Woong Kang, Kang-Min Ahh, Jong-Ho Lee, Byung-Soo Kim. Enhanced bone formation by marrow-derived endothelial and osteogenic cell transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009.
- Scholzen T y Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of cellular physiology* 182:311–322 (2000)
- Sekiguchi S, Yasukawa K, Inouye K. Effects of Polyethylene Glycol on Bovine Intestine Alkaline Phosphatase Activity and Stability. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011 Nov 7.
- Sengers B, Dawson J, Oreffo R. Characterisation of human bone marrow stromal cell heterogeneity for skeletal regeneration strategies using a two-stage colony assay and computational modelling. *Bone* 46 (2010) 496-503.
- Seok-Jung Kim, Won-Jong Bahk, Cheong-Ho Chang, Jae-Deog Jang and Kyung-Hwan Suh. Treatment of osteonecrosis of the femoral head using autologous cultured osteoblast: a case report. *Journal of Medical case reports* 2008, 2-58.
- Seok-Jung Kim, Yong-Woon Shin, Kyu-Hyun Yang, Sang-Bum Kim, Moon-Jib Yoo, Suk-ku Han, Soo-Ah Im, Yoo-Dong Won, Yerl-Bo Sung, Taek-Soo Jeon, Cheong-Ho Chang, Jae-Deog Jang, Sae-Bom Lee, Hyun-Cho Kim and Soo-Young Lee: A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2009, 10:20 1471-2474
- Shih Tak Khew and Yen Wah Tong. The specific recognition of cell binding sequence derived from type I collagen by Hep3B and L929 cells. *Biomacromolecules* 2007, 8, 3153-3161.
- Simmons DJ 1996 The in vivo role of bone marrow fibroblast-like stromal cell. *Calcified Tissue International* 58 129-132.
- Smith JH, Denhardt DT. Molecular cloning of a tumor promoter-inducible mRNA found in JB6 mouse epidermal cells: induction is stable at high, but not at low, cell densities. *J Cell Biochem* 1987; 34:13–22.
- Sobotta W, *Histología*, 2ª edición, Médica Panamericana 2009.
- Sundaram S, Niklason LE. Smooth Muscle and Other Cell Sources for Human Blood Vessel Engineering Cells Tissues Organs. 2011 Oct 25.
- Takahashi K, Saitoh A, Yamada M, Iwai T, Inagaki M y Yamada M. Dexamethasone Indirectly Induces Ndr2 Expression in Rat Astrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 00:000–000 (2011).

- Terraz C, Toman Dave, Delauche M, Ronco P y Rossert J. α 1(I) Binds to a Far Upstream Sequence of the Mouse Pro- α 1(I) Collagen Gene and Represses Its Expression in Osteoblasts. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 276, No. 40, Issue of October 5, pp. 37011–37019, 2001.
- Trombi L, D'Álesandro D, Pacini S, Fiorentino B, Scarpellini M, Fazzi R, Galimberti S, Guazzini S y Petrini M. Good manufacturing practice-grade fibrin gel is useful as a scaffold for human mesenchymal stromal cells and supports in vitro osteogenic differentiation. Transfusion Vol. 48, 2008.
- Turanza Juan Yuri ,“Posgrado en cirugía y traumatología bucomaxilofacial”, 2000, Imprenta Gráfica, Comodoro Rivadavia.
- Wang A, Ding X, Sheng S and Yao Z. Bone Morphogenetic Protein receptor in the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. Yonsei Med J 51(5): 740-745, 2010.
- Yun HS, Kim SH, Khang D, Choi J, Kim HH, Kang M. Biomimetic component coating on 3D scaffolds using high bioactivity of mesoporous bioactive ceramics. Int J Nanomedicine. 2011;6:2521-31.
- Zhang W, Käpylä J, Puranen J, Knight C, Tiger C, Pentikäinen O, Johnson M, Farndale R, Heino J and Gullberg Donald. α 11b1 integrin recognize the GFOGER sequence in interstitial collagens. J of Biological Chemistry, Vol 278 No. 9 7270-7277, 2003.