



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

CONSTRUCTO TISULAR PARA LA REGENERACIÓN DE DEFECTOS  
DE HUESOS LARGOS EN CONEJOS NUEVA ZELANDA

PROYECTO PAPIIT IN221315

**TESIS**

Para obtener el título de

**Cirujano Dentista**

Presenta

**Higuera Martínez Germán Eduardo**

Director de Tesis:

Dr. Raúl Rosales Ibáñez

LOS REYES IXTACALA, TLALNEPANTLA, MÉX

2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.





## Contenido

1. RESUMEN .....	4
2. INTRODUCCIÓN .....	6
3. MARCO TEÓRICO.....	9
4. JUSTIFICACIÓN. ....	38
5. HIPÓTESIS ALTERNA. ....	41
6. HIPÓTESIS NULA.....	41
7. OBJETIVO GENERAL.....	41
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	41
9. METODOLOGÍA. ....	42
10. RESULTADOS .....	75
11. DISCUSIÓN .....	98
12. CONCLUSIONES .....	105
13. REFERENCIAS.....	107



## 1. RESUMEN

A la largo de la historia, la ciencia ha buscado distintas formas alternativas para mejorar o regenerar las funciones ausentes o perdidas de los tejidos y órganos del cuerpo humano. La medicina regenerativa basada, principalmente, en la manipulación de células madre en combinación con biomateriales como lo es el Quitosano/Poli-L-Lisina, tiene como finalidad el regenerar tejidos. En este sentido, el aspirado de médula ósea de conejos representa una alternativa para la obtención de células mesenquimal es y su posterior uso autólogo y así plantear alternativas con ventajas superiores a los procedimientos tradicionales.

Para el presente estudio fueron empleados 3 conejos de la raza Nueva Zelanda de un peso de entre 3-4 kg los cuales fueron asignados aleatoriamente en 2 grupos experimentales (Grupo Control y Grupo Andamio/células). A dichos conejos se les llevó a cabo el control de peso para la dosificación adecuada de anestesia general por medio de infiltración intramuscular de ketamina.

Para el grupo control, se realizó un defecto radial segmentario de 10mm de largo, al cual, posteriormente se colocó una membrana de colágeno para evitar la migración celular ajena a la zona intervenida.

Para el grupo Andamio/células Se tomaron las medidas de asepsia y antisepsia en el área quirúrgica, para que posteriormente llevar a cabo la técnica de aspirado medular con aguja tipo Ossgood en la porción móvil de la epífisis femoral. En seguida se recolectó la médula ósea la cual fue introducida inmediatamente en tubo Vacutainer con EDTA. Posteriormente dichas muestras fueron cultivadas, para efectuar el aislamiento, purificación y una vez obtenidas las células mesenquimales se realizaron las pruebas de viabilidad tanto en las células en cultivo como en las células Sembradas en los andamios de Quitosano/Poli-L-Lisina (azul Trypan, Live/Dead), de proliferación (MTT, Alamar Blue, Azul de Toluidina). Y con el fin de evaluar la adhesión celular Se realizó SEM en los andamios con células Sembradas



y sin ellas. Se realizó prueba de troncalidad para marcador CD 44 y negativo para CD 34, y finalmente se implantaron los andamios con células mesenquimales al grupo experimental correspondiente en el que se comparó la regeneración ósea por medio de técnica histológica (H&E).

Se obtuvieron 5 ml de médula ósea, los cuales fueron centrifugados para la obtención de anillo celular, el cual se sembró en frascos de cultivo T25, dicha técnica permitió que en un plazo 14 días las células llegaran a un estado confluyente del 60 %, las cuales presentaban adherencia al plástico con morfología fibroblastoide. Para la técnica de purificación por medio de perlas magnéticas indicó que el marcador CD44, es un marcador positivo para células mesenquimales, ya que estas fueron separadas del resto. El ensayo Live/Dead mostró por medio de fluorescencia la viabilidad celular (Verde: células vivas y Rojo: células muertas), las pruebas de viabilidad y proliferación por medio de MTT y AB demostraron un aumento en la proliferación celular del día 3 al 7 y un aumento importante al día 14. La eficiencia de la formación de colonias fue evaluada con Azul de Toluidina, revelando que las formaciones de colonias aumentan del día 7 al 14. Esto basado en la observación con un microscopio de disección de luz.

Las células mesenquimales de conejo mostraron positividad para el marcador de membrana CD44, que son similares a las humanas, y negativas a CD34.

Las muestras histológicas revelaron que en el grupo andamio con células existió la formación de hueso desorganizado o primario, en tanto que en el grupo control presentó hueso maduro con sus estructuras celulares.

Los resultados de este estudio nos muestran que las células mesenquimales provenientes de médula ósea de fémur en comparación con otros sitios anatómicos, presentan una buena fuente de obtención. En tanto que la técnica de aislamiento de células de médula ósea completa sin tratamiento, es uno de los métodos más apropiados para el cultivo de células de esta referencia anatómica.

El fémur de conejos representa una buena fuente de células madre mesenquimales autólogas para su posterior uso en ensayos *in vitro* e *in vivo*.



## 2. INTRODUCCIÓN.

El Ser humano durante su formación como organismo adulto, está expuesto a recibir estímulos de todas partes, sean químicos, físicos, mecánicos o ambientales. Dicha exposición provoca una alta incidencia en alteraciones en el organismo de tipo traumático, las cuales pueden ser provocadas por factores tanto extrínsecos como intrínsecos, considerando que el propio organismo tiene la capacidad de sanar, curar o regenerar las lesiones por medio de varios factores presentes, que van desde procesos inflamatorios hasta, remodelaciones. Además, posee una gran capacidad de reparación cuando es lesionado, ya que durante este proceso interactúan diversos factores tales como células, factores de crecimiento, y expresiones proteicas (Sfeir, Ho, Doll, Azari, & Hollinger, 2005).

Los daños o pérdidas tanto de tejidos como órganos, tras un daño requieren ser remplazados por medio de diferentes tratamientos como lo son xenoinjertos, aloinjertos o autoinjertos (Shin, Yoshimoto, & Vacanti, 2004). Los aloinjertos poseen la característica que tienen que Ser sometidos a diversas técnicas de procesamiento como liofilizaciones, irradiación con el fin de remover las proteínas inmunogénicas y en consecuencia los riesgos de origen inmunitario (Urist, 1957). El hueso autólogo ha sido el “*Gold Standard*” en los procedimientos de reconstrucciones óseas, sin embargo este procedimiento compromete al paciente a una Segunda cirugía lo que implica mayores costos (Haddad, Peel, Clokie, & Sandor, 2006).

A la presente problemática surge un nuevo reto para las áreas médicas, la “*Ingeniería Tisular*”, la cual es un tipo de terapia que conjunta elementos como factores de crecimiento, células troncales y matrices tridimensionales, que son elementos que lleven a una terapia tisular más efectiva, menos invasiva y donde los rechazos de origen inmunológico son significativamente disminuidos. La ingeniería tisular tiene la capacidad de inducir a la regeneración de tejido óseos por medio de células osteogénicas y de factores de crecimiento osteogénicos a lo largo de una matriz sintética osteoconductiva (Liu et al., 2011).



Las matrices sintéticas o andamios forman una parte importante dentro de la ingeniería tisular, pues sus características proporcionan una mínima reacción antígeno-anticuerpo, tienen una naturaleza antibacterial intrínseca, poseen la habilidad de ser moldeadas en diferentes formas, con estructuras porosas, adecuación para el crecimiento celular, capacidad osteoconductiva. Recientemente se han desarrollado los andamios a base de quitosano para aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejido óseo. Este compuesto es un derivado desacetilado de la quitina, posee un alto peso molecular, es el segundo biopolímero natural más abundante encontrado en los exoesqueletos de los crustáceos marinos y paredes celulares de los hongos, tiene una naturaleza catiónica que es la responsable de la interacción electrostática con glicosaminoglicanos (GAG), proteoglicanos y moléculas negativamente cargadas (Di Martino, Sittinger, & Risbud, 2005). En combinación con cultivos celulares el quitosano es un medio que favorece la inducción osteogénica.

Las células de origen mesenquimal son células multipotentes que tienen la capacidad de diferenciación de multilineajes, adherirse al plástico, con una apariencia fibroblastoide y por presentar marcadores específicos de superficie de membrana (Tan, Ahmad, Selvaratnam, & Kamarul, 2013). Estas células pueden ser aisladas por casi todos los tejidos y expandidas *in vitro* y se ha demostrado que las células madre mesenquimales pueden ser activas y reclutadas a los sitios de daño tisular y donde ellas regenerarán nuevo tejido y repararán el defecto (Ma, y otros, 2014).

En los últimos años las lesiones a los tejidos óseos han ido en aumento, ya que día con día el ser humano se expone a traumatismos o ciertas condiciones más específicas como lo son síndromes congénitos, hereditarios, genéticos, metabólicos y cirugías neoplásicas (Cancedda, Giannoni, & Mastrogiacomo, 2007). En la actualidad existe una serie de cambios importantes a nivel poblacional mundial en relación a los traumatismos, lo que significa que los avances tecnológicos en la medicina, enfrenten este reto, lo que ha creado que la expectativa de vida se ha incrementado de manera significativa y el número de muertes por procesos



infecciosos ha disminuido (Nieto Lucio, y otros, 2012). Por otro lado la tasa de morbilidad durante la infancia y la vida adulta ha aumentado de manera considerable a causa de traumatismos (Court-Brown & Caesar, 2006). La incidencia de alteraciones óseas como la osteoporosis, las fracturas o la combinación de estas son cada día más frecuentes y un riesgo para la salud.

En general las fracturas tardan en sanar en un promedio de 6 a 8 semanas, siempre y cuando los segmentos sean reducidos o las lesiones no tengan un defecto de no unión o como se conoce en ortopedia, “*defecto de tamaño crítico*”, esto es, que el tamaño sea demasiado extenso, provocando que el organismo no tenga la capacidad de sanarlo espontáneamente (Spicer, y otros, 2012). Esto ha provocado que se requieran otros tratamientos previamente probados en modelos animales que van desde pequeños hasta animales de gran tamaño; uno de estos modelos es el conejo que ha sido el modelo común en pruebas preclínicas como aplicaciones en ortopedia, alteraciones cardiovasculares, entre otras. Las células madre mesenquimales obtenidas de conejo se han estado usando rutinariamente en investigación para las aplicaciones en Medicina Regenerativa ya que las células mesenquimales provenientes de este biomodelo presenta ciertas características similares a las de los humanos fenotípicamente y potencial de diferenciación hacia distintos linajes como lo son osteogénico, adipogénico, condrogénico. Tanto el conejo como humano comparten el CD44, CD29 como marcadores de membrana positivos entre otros y CD45, CD34, CD14 como marcadores negativos (Lee, y otros, 2014), (Bakhtina, Tohfafarosh, Lichtler, & Arinzch, 2013).

En el presente estudio se evaluó y comparó la capacidad regenerativa de células madre mesenquimales (CMM) autólogas provenientes de Médula Ósea de Fémur en combinación con andamios a base de Quitosano con poli-L-lisina, siendo este un material que favorece la adherencia celular implantados en radios de Conejos Nueva Zelanda.



### 3. MARCO TEÓRICO.

#### GENERALIDADES DE HUESO: HISTOLOGÍA ÓSEA

El hueso es un tejido de origen ectomesenquimal , conectivo mineralizado altamente irrigado por vasos sanguíneos, conformado principalmente por laminillas de matriz ósea (Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, Alobera Gracia, Del Canto Pingarrón, & Blanco Jerez, 2006).

El hueso es la unidad básica del sistema esquelético humano, es un tejido rígido que constituye la mayor parte del esqueleto de los vertebrados superiores, protege los órganos vitales, dirige el movimiento mecánico, almacén de células hematopoyéticas y mantiene la homeostasis del hierro, está formado por células y una matriz intercelular. Su principal componente orgánico, las fibras colágenas las cuales forman un armazón de refuerzo. Las superficies externas están cubiertas por una capa doble de tejido conectivo (periostio). La capa externa del periostio es tejido conectivo denso; la capa interna u osteogénica, es un tejido más laxo que contiene precursores de células óseas.

#### CLASIFICACIÓN

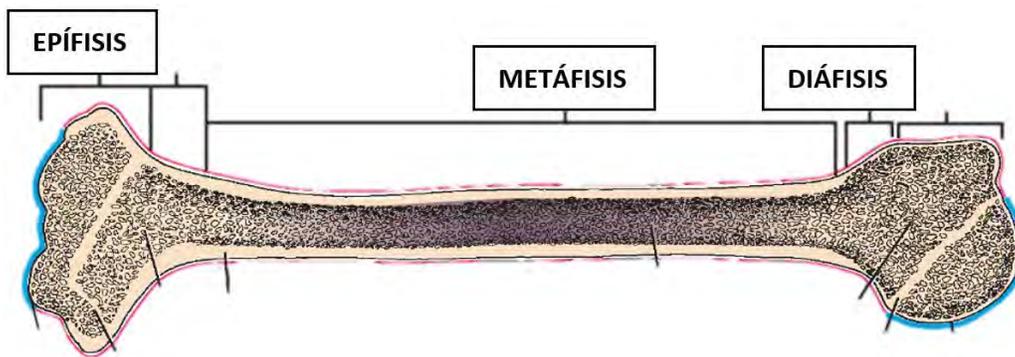
Los huesos poseen varias clasificaciones: localización, forma, tamaño, origen, desarrollo, disposición de la matriz y textura (De la Roza, Damron, & Murray , 2012).

localización	Esqueleto axial, esqueleto apendicular.
Forma	Huesos planos, huesos tubulares, irregulares, huesos Sesamoides, accesorios o supernumerarios
tamaño	Huesos largos y cortos
Origen y desarrollo	Hueso endocondral e intramembranoso
Disposición de la matriz	Hueso lamelar o Secundario y hueso entretejido o primario
Textura	Hueso compacto y hueso esponjoso

## ESTRUCTURA TÍPICA DE LOS HUESOS LARGOS

Los huesos largos están constituidos por diferentes estructuras y Se dividen en diferentes regiones.

- Epífisis. Es su extremo bulbar, constituida principalmente por hueso esponjoso rodeados de una delgada capa de Separado de la diáfisis por la placa epifisiaria cartilaginosa.
- Diáfisis. Anatómicamente tiene forma de cilindro de pared gruesa que normalmente está formada por hueso compacto, forma el cuerpo de hueso que rodea a una cavidad medular central voluminosa revestida por endostio ocupada por médula ósea.
- Metáfisis. Región intermedia. (Ross & Pawlina, 2011).



## FUNCIÓN DE LOS HUESOS.

- Soportar el esfuerzo mecánico
- Protege los tejidos y órganos más débiles
- Contiene al tejido hematopoyético
- Forma un sistema de palancas y poleas que multiplican y concentran las fuerzas contráctiles del músculo.
- Posee matriz ósea que funciona como lugar importante de almacenamiento de calcio y otros minerales esenciales.

Además de las funciones mecánicas, desempeña una función metabólica importante como depósito de calcio movilizable, que puede Ser tomado o



depositado a medida que lo exige la regulación homeostática de la concentración de calcio en la sangre y en otros líquidos del cuerpo.

### COMPOSICIÓN DEL HUESO

Como los restantes tejidos conjuntivos, el hueso está formado por células, fibras, y sustancia fundamental amorfa, pero a diferencia de los otros tejidos, sus componentes extracelulares están calcificados y le convierten en un material duro, firme e idealmente adecuado para su función de soporte y protección, el hueso está formado principalmente por células de tejido óseo (células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos) y Matriz ósea.

1. **Células osteoprogenitoras.** Estas células constituyen una población de células madre derivadas del mesénquima que poseen la capacidad de dividirse por mitosis y diferenciarse o especializarse tanto en estructura como en función para después en células óseas maduras, se diferencian en osteógenas, si los niveles de oxígeno son elevados debido a la alta vascularización, o en condrógenas si la concentración de oxígeno, en el lugar que las rodea disminuye notablemente por la baja vascularización (Ham Cormack, 1988).

Estas células poseen forma de huso o fusiformes, con núcleos alargados u ovoides y escaso citoplasma acidófilo levemente basófilo. Se localizan en la capa más profunda (capa osteógena) del periostio la cual es una membrana que recubre la superficie externa de los huesos y en el endostio, que reviste las superficies internas de todas cavidades intraóseas (médula ósea y conductos de Havers del hueso compacto y absolutamente todos los espacios de hueso esponjoso).

2. **Osteoblastos.** Son las principales células formadoras de hueso, células indivisibles, relativamente grandes cuya forma varía generalmente entre redonda y poligonal, poseen núcleos grandes, redondos y citoplasma basófilo en extremo debido a la presencia de la nucleoproteína ribosa, por consecuencia posee aparato de Golgi bien desarrollado, con abundantes mitocondrias alargadas, tienen muchas prolongaciones citoplasmáticas digitoformes con abundantes microfilamentos que se extienden hacia la matriz ósea en desarrollo para hacer



contacto con las prolongaciones de los osteoblastos vecinos. Los osteoblastos contienen gran actividad de la enzima *fosfatasa alcalina* la cual está en íntima relación con la calcificación del osteoide, poseen una disposición epiteliode o que semeja epitelio cuboide simple sobre superficies donde se está depositando hueso nuevo. Su principal función es sintetizar y secretar los componentes macromoleculares orgánicos de la matriz ósea. Esta se deposita alrededor de los cuerpos celulares de los osteoblastos y de sus prolongaciones citoplasmáticas, donde una vez rodeados de matriz, los osteoblastos se consideran maduros y pasan a ser osteocitos.

3. **Osteocitos.** Son células óseas con diferenciación completa que se encuentran en cavidades de la matriz ósea llamada *lagunas*, también, las células principales del tejido óseo maduro. Además son células que quedaron atrapadas dentro de la matriz ósea, incapaces de dividirse ni de secretar matriz, poseen prolongaciones citoplasmáticas largas y finas llamadas *filopodios* que salen a partir del cuerpo celular, y viajan a través de finos canales también conocidos como *canaliculos* de la cavidad lagunar, aislados uno de otro por la presencia de matriz ósea y donde el único contacto con otro osteocito es a través de sus filopodios. Los osteocitos jóvenes se encuentran cerca de la superficie del hueso en lagunas perfectamente redondeadas y donde los osteocitos viejos se encuentran más alejadas de la superficie en lagunas aplanadas. Poseen citoplasma con ligera basofilia, el núcleo muestra cromatina condensada que se tiñe de color oscuro, hay una pérdida importante del retículo endoplasmico rugoso y del complejo de Golgi a diferencia de los osteoblastos.
4. **Osteoclastos.** Son células grandes (de 20 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro) y multinucleadas (de 2 a 50 núcleos) poseen citoplasma acidófilo con abundantes lisosomas y mitocondrias y un complejo de Golgi bien desarrollado, el osteoclasto libera ácido, colagenasa, entre otras enzimas que se encargan de destruir la matriz ósea y liberan minerales, La extracción de los cristales de hidroxapatita requiere de un medio acidificado, esto se produce porque los osteoclastos poseen en el citoplasma anhidrasa carbónica que genera ácido carbónico a partir del dióxido de carbono y agua, a este proceso se le es



denominado *resorción ósea*. Estos osteoclastos Se encuentran frecuentemente en cavidades poco profundas de la superficie del hueso, llamadas *lagunas de Howship*, y es generada por la acción erosiva que ejercen los osteoclastos a la superficie ósea, generalmente pueden apreciarse en los sitios de resorción cerca de los extremos de los huesos largos en crecimiento, la parte del osteoclasto que Se encarga directamente de la resorción ósea es una estructura transitoria y sumamente móvil, al cual Se le denomina *borde arrugado*, este borde consiste en prolongaciones digitiformes ramificantes

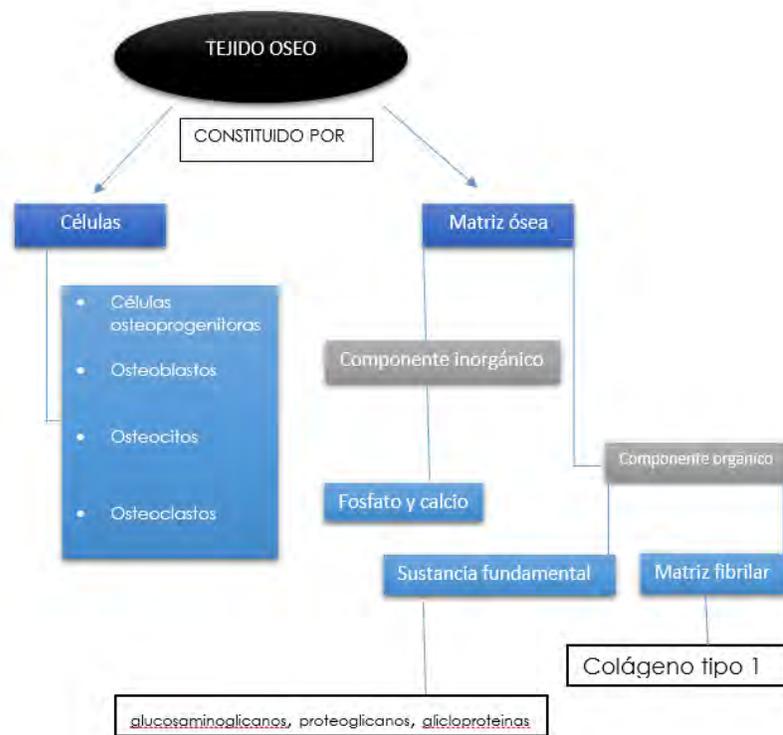
5. **Matriz ósea.** Es la sustancia intercelular del hueso, posee una estructura bien organizada, de composición homogénea, posee dos componentes principales: sales inorgánicas o mineral óseo y matriz orgánica u osteoide. La porción orgánica que representa el 35% consta en su mayor parte de fibras osteocolágenas unidas en haces de 5  $\mu\text{m}$  de grueso por una sustancia de cemento fundamental, que consta principalmente de glucosaminoglucanos (combinación de proteínas y polisacáridos).

5.1 Componente orgánico u osteoide constituye alrededor de 50% de volumen y 25% del peso óseo ; Se compone de fibras y sustancia fundamental no mineralizada

- a. Matriz amorfa o también conocida como sustancia fundamental. Conformada por glucosaminoglucanos, proteoglicanos, glicoproteínas y moléculas de adhesión como la osteonectina (interviene como adhesivo entre fibras colágenas y cristales de hidroxiapatita), osteocalcina (facilita el depósito de sales de calcio en las estriaciones de las fibras colágeno).
- b. La Matriz fibrilar constituida por colágeno tipo 1 en un 90-95% que corren de manera escalonada muy Semejante a la de tendones, piel y fascias, en estas fibrillas Se depositan los cristales de hidroxiapatita por una actividad intensa de la enzima fosfatasa alcalina encargada de extraer las sales de calcio de los capilares sanguíneos vecinos hacia los centros de osificación y calcificación,

estos depósitos son realizados por la actividad de glicoproteínas (osteocalcina y osteopontina).

5.2 Componentes inorgánicos. Se compone principalmente de calcio y fosfato, con poco bicarbonato, citrato, magnesio y potasio, Se localiza principalmente en el cemento que hay entre las fibras osteocolágenas, estos forman cristales similares a las agujas de hidroxiapatita (Leeson, Leeson, & Paparo, 1988, págs. 167-188)(PaulSen & Acuña Diaz, 1990).



### HISTOGÉNESIS ÓSEA

Durante el desarrollo embrionario, el primer tejido óseo que aparece es el hueso primario o entretejido, este es un hueso inmaduro formado por una red de tejido óseo esponjoso que posteriormente será sustituido por hueso secundario, dependiendo del tipo de hueso. El hueso primario se puede formar por cualquiera de los siguientes mecanismos:

- Osificación intramembranosa



- Osificación endocondral

La principal diferencia de estas es la presencia de cartílago en uno de sus estadios.

#### Osificación endocondral.

Los huesos de la base del cráneo, de la columna vertebral, de la pelvis y de las extremidades se llaman huesos cartilaginosos, porque se forman inicialmente sobre un modelo o un molde de cartílago hialino, que es remplazado posteriormente por hueso.

Etapas de formación de hueso endocondral.

1. **Modelo de cartílago.** Embriológicamente, se modela un prototipo de cartílago hialino que va asemejando al hueso que posteriormente lo sustituirá.
2. **Collar óseo perióstico.** Los pequeños capilares van penetrando e invadiendo el pericondrio y las células madre mesenquimal se ubican en la superficie interna. Se convertirán en osteoprogenitoras, algunas de esas células se diferencian en osteoblastos, los cuales segregan su matriz ósea (osteóide) formando espículas de hueso primario en el pericondrio que posteriormente pasará a llamarse periostio. La fusión de estas espículas forma un collar óseo perióstico de hueso membranoso junto alrededor del cartílago y formando hueso endocondral.
3. **Proliferación.** Los osteoblastos comienzan a formar espículas que posteriormente se fusionan unas con otras, comienza a ver una proliferación de condrocitos, formando columnas de células aplanadas orientadas de forma paralela a lo largo del collar óseo.
4. **Hipertrofia.** Los condrocitos que rodean al collar muestran una hipertrofia de forma rápida, convirtiéndolos en células de gran tamaño, redondas unas entre sí, lo que conlleva a lagunas tubulares llenas de condrocitos hipertróficos.
5. **Calcificación.** Conforme la hipertrofia progresa las tiras largas de condrocitos hipertróficos comienzan a calcificarse, los nutrientes, el oxígeno,



desechos celulares no permean a través de la matriz, lo que provoca la muerte de los condrocitos.

6. **Formación de cavidad medular primaria.** Los condrocitos muertos y su matriz cartilaginosa ya calcificada provoca que los condroclastos comiencen a degradarlos y por consecuencia comienza a ensancharse la luz del túnel óseo en crecimiento, provocando que se convierta en la cavidad medular primaria del hueso.
7. **Brote perióstico.** Comienza a ser invadido por pequeños vasos y tejidos perivasculares que penetran en el periostio que circunda la cavidad medular primaria, los condrocitos muertos son remplazados por el brote y sus ramas, las osteoprogenitoras y las células madre provenientes de la médula ósea proporcionadas por los vasos sanguíneos invasores se depositan sobre la matriz calcificada cartilaginosa.
8. **Osificación.** Las células osteoprogenitoras se dividen y diferencian en osteoblastos depositando hueso primario por medio de la secreción de la matriz ósea sobre el cartílago calcificado, el hueso primario y la matriz cartilaginosa calcificada posteriormente son reabsorbidas para formar hueso secundario que en los adultos hace referencia al hueso denso y esponjoso.

#### OSIFICACIÓN INTRAMEMBRANAL.

Se forma por medio de condensaciones mesenquimal es formando placas membranales, las células procedentes de esta membrana compuesta de tejido conectivo se diferencian directamente en osteoblastos, estos comienzan con la formación de matriz ósea rodeándose o quedando atrapados en ella y posteriormente se mineraliza formando espículas óseas. Los demás osteoblastos de igual manera generan osteoide y por consiguiente espículas óseas fusionándose con la de los demás formando una red de tejido óseo esponjoso primario. Solo algunos huesos poseen este tipo de osificación, principalmente los del cráneo (Temporales, Occipitales, mandíbula y maxilar) y el collar óseo del periostio de los huesos endocondrales.



## FORMACIÓN DE HUESO SECUNDARIO

O también conocido como hueso lamelar, la formación de hueso Secundario está constituido por un proceso de remodelación donde los osteoclastos erosionan la matriz primaria, los vasos sanguíneos, los nervios y vasos linfáticos invaden la cavidad y las células osteoprogenitoras localizadas en la periferia de los vasos sanguíneos o tejido conectivo perivascular Se depositan sobre la pared de la cavidad. Los osteoblastos derivadas de estas células y los osteocitos liberados de sus lagunas por acción de la reabsorción comienzan a depositar su matriz en forma de laminillas concéntricas, esta remodelación ayuda a los huesos en crecimiento para soportar fuerzas y cargas de forma continua (Paulsen & Acuña Diaz, 1990) (Fawcett, 1991) (Ham Cormack, 1988) (Geneser, 1990).

## REPARACIÓN ÓSEA

Las alteraciones óseas como la osteoporosis y las fracturas o la combinación de estas son cada día más frecuentes y un riesgo para la salud, en general las fracturas tardan en sanar en un promedio de 6 a 8 Semanas, siempre y cuando los segmentos sean reducidos o las lesiones no tengan un defecto de no unión o como Se conoce en ortopedia, “*defecto de tamaño crítico*”, esto es, que el tamaño Sea demasiado extenso, provocando que el organismo no tenga la capacidad de sanarlo espontáneamente (Spicer et al., 2013).

Después de una fractura Se desencadenan una Serie de eventos que incluyen la hemorragia y la organización del coágulo por medio de tejido de granulación ordinario. El tejido de granulación Se convierte en tejido conjuntivo más denso. Dentro de él Se desarrollan cartílago y fibrocartílago, constituyéndose así el callo fibrocartilaginoso que llena la fisura entre los extremos de los fragmentos, la formación de hueso comienza con las células madre mesenquimales (osteoprogenitoras) de la capa más profunda del periostio y el endostio, este proceso de reparación consta de 4 etapas o estadios los cuales son:

- Fase inflamatoria
- Fase reparativa (formación de fibrocartílago)
- Fase reparativa (formación de callo duro)



- Fase remodeladora

#### Fase inflamatoria.

En esta etapa hay presencia de daño vsculo-endotelial, provocando así hemorragia, agregación plaquetaria con su respectiva degranulación, esta degranulación plaquetaria libera factores de crecimiento y provoca que se disparen señales quimiotácticas, citoquinas, las plaquetas conducen la activación de cascada de coagulación, se presenta una disminución en las concentraciones de oxígenos provocando el cambio de pH, induciendo la liberación de células polimorfo nucleares, linfocitos, monocitos sanguíneos, macrófagos, sistema de complemento, por medio de la liberación de quimiocinas, los pericitos y las células osteoprogenitoras son atraídas al sitio de lesión. Posterior a esto, la formación de coágulo de fibrina da como resultado la formación de un granuloma de reparación, este granuloma de reparación también es llamado como callo externo (Sfeir, Ho, Doll, Azari, & Hollinger, 2005)(O Grundnes & Reikers, 1993).

#### Fase reparativa (formación de fibrocartílago)

Pasando los primeros 3 a 5 días de la fractura, comienza la formación de pequeños capilares que penetran el hematoma, el rol del tejido calloso es proveer de estabilidad mecánica al sitio de la fractura, durante este periodo el PH del sitio de la lesión es ácido, lo que permite que los fibroblastos se movilicen hacia el hematoma y comiencen con la secreción de colágena de diversos tipos, (Sandberg, Aro, Multimaki, Aho, & Vuorio, 1989). Estos autores identificaron 15 isotipos de colágeno de los cuales 5 son fibrilares (I, II, III, V, XI), y también células madre mesenquimal es provenientes del periostio que comienzan su diferenciación a condroblastos y osteoblastos provocando que el tejido de granulación se convierta en tejido más denso, en su interior se conforma fibrocartílago constituyendo así el callo de fibrocartílago, este fibrocartílago sella las fisuras entre los extremos de los segmentos, conforme el proceso de reparación continua, el PH de la zona comienza a neutralizarse, tornándose ligeramente alcalino, lo cual es óptimo para



la actividad de la fosfatasa alcalina y su rol en la mineralización del callo (Bolander, 1992; O Grundnes & Reikerås, 1993; Oliver Grundnes & Reikerås, 1993).

Fase reparativa (formación de callo duro).

Los vasos sanguíneos comienzan a invadir el callo fibrocartilaginoso, las concentraciones de oxígeno comienzan a incrementarse, provocando la hipertrofia de condrocitos, calcificación de la matriz cartilaginosa y por el contrario comienza un incremento de los osteoblastos, estos se encargan de segregar su matriz ósea u osteoide sobre el callo cartilaginoso estimulando la formación de hueso primario y así sustituyendo progresivamente el callo de fibrocartilago, este proceso es semejante a lo que ocurre en la osificación endocondral.

Fase Remodeladora.

Esta es la última etapa del proceso de reparación ósea, formación de hueso lamelar y la reabsorción del exceso de callo por medio de la actividad osteoclastica (Albrektsson & Johansson, 2001; Doblaré, García, & Gómez, 2004; Hadjidakis & Androulakis, 2006).

## REPARACIÓN ÓSEA

Los daños o pérdidas tanto de tejidos como órganos, tras un daño como lo es una fractura ósea requieren ser atendida por medio de diferentes tratamientos como lo son xenoinjertos, aloinjertos o autoinjertos (Shin, Yoshimoto, & Vacanti, 2004). Las principales características que debe de llevar cualquier tratamiento orientado a la regeneración ósea son osteoinductivas, osteoconductoras y osteointegración.

- Osteoinducción es el proceso por el cual se induce la osteogénesis, es un fenómeno que se presenta en los procesos de sanación ósea donde las células indiferenciadas osteoprogenitoras pasan a convertirse en osteoblastos y comenzar con el proceso de regeneración ósea, este paso es fundamental durante la reparación ósea.
- Osteoconducción hace referencia al crecimiento óseo sobre una superficie, este fenómeno se aprecia regularmente en los casos de implante óseo



- Osteointegración es aquella capacidad que tiene el organismo para aceptar o en su caso rechazar el material que se pretende implantar o sustituir al tejido óseo huésped (Albrektsson & Johansson, 2001).

Los aloinjertos poseen la característica que tienen que ser sometidos a diversas técnicas de procesamiento como liofilizaciones, irradiación con el fin de remover las proteínas inmunogénicas y en consecuencia los riesgos de origen inmunitario (Urist, 1967). El hueso autólogo ha sido el “*Gold Standard*” en los procedimientos de reconstrucciones óseas por lo que este procedimiento comprometen al paciente a una Segunda cirugía y de mayores costos (A. J. Haddad, Peel, Clokie, & Sa, 2006).

A la presente problemática surge un nuevo reto para las áreas médicas, la “*Ingeniería de tejidos*”, este tipo de terapia conjunta todos aquellos elementos como son los factores de crecimiento, las células troncales y las matrices tridimensionales. Estos son los elementos que lleven a una terapia tisular más efectiva, menos invasiva y donde los rechazos de origen inmunológico prácticamente no existen. La ingeniería de tejidos tiene la capacidad de inducir a la regeneración de tejido óseo por medio de células osteogénicas, factores de crecimiento osteogénico a lo largo de una matriz sintética osteoconductiva (Liu et al., 2011).

### INGENIERÍA DE TEJIDOS ÓSEOS

Actualmente, la gran mayoría de los tratamientos para enfermedades crónicas degenerativas que amenazan la vida son paliativos, otros retrasan la progresión de la enfermedad y la aparición de complicaciones asociadas con la enfermedad subyacente. Pocas terapias revierten significativamente el curso de estas enfermedades. Actualmente, en los últimos años han surgido disciplinas que son capaces de sanar, curar o detener el curso de estas enfermedades y una de ellas es la Medicina Regenerativa.

Basada fundamentalmente en los preceptos sobre las células madre y su capacidad de convertirse y diferenciarse en células de diferentes tejidos (Hernández Ramírez & Dorticós Balea, 2004). Esta terapéutica integra una gran cantidad de disciplinas en el área de las biomédicas siendo esta una rama multidisciplinaria que mantiene



relaciones estrechas con otras áreas como lo son; hematología, inmunología, biología celular y molecular. Las medidas terapéuticas empleadas pueden incluir trasplante de células madre, el uso de moléculas solubles, terapia génica e ingeniería de tejidos (Ramírez Hernández, 2009).

Tanto la medicina regenerativa como la ingeniería de tejidos acuñan términos que aplican los principios de ingeniería y ciencias de la vida o biológicas para el desarrollo de sustitutos biológicos que Sean capaces de restaurar, mantener y optimizar la función de los tejidos (El-Din & Saber, 2009). La ingeniería de tejidos Se refiere a la práctica de combinar andamios o matrices tridimensionales, células con capacidad de replicación y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales (Giannoudis, Einhorn, & Marsh, 2007).

Con el fin de lograr una regeneración de tejidos exitosa combinada con la ingeniería tisular son necesarios diferentes factores, como lo son:

<b>Células madre adultas</b>
<b>Andamios</b>
<b>Factores de crecimiento</b>

Las células madre poseen un rol crucial y un recurso prometedor en la regeneración de tejidos, debido a sus propiedades de poder reparar, proliferar y diferenciación, poseen una interacción célula con célula, producción biomolecular y formación de matriz extracelular, los recursos por los cuales las células son usadas en la ingeniería de tejidos son: Ser autólogos, alogénicos, xenogénicos. Un donador ideal celular para ingeniería de tisular son aquellas a las cuales son fácil acceso y de expansión sin alterar aquellas su fenotipo y función. Son también, las que poseen multipotencialidad para diferenciarse o transdiferenciarse en una variedad de tejidos o en órganos específicos con funciones especializadas y con una mínima respuesta inmunológica (Shieh & Vacanti, 2005).

Los factores de crecimiento, tales como proteínas morfogenéticas óseas, células madre adultas combinadas o adaptadas en andamios implantadas en sitios diana,



en otras palabras la ingeniería de tejidos para generar nuevo tejido, comprende la combinación de células vivas, en un molde para reproducir una estructura tridimensional tisular que sea funcional y Semejante al tejido que debe remplazar, pero el componente principal y unidad básica funcional y centro de nuestro interés son las células madre.

#### ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LAS CÉLULAS MADRE.

Las células troncales, también llamadas células madre poseen su origen en la literatura científica a mediados del siglo XIX por el biólogo alemán Ernst Haeckel que acuñó el término “*STAMMZELLE*”, para así describir que cada organismo unicelular proviene de un ancestro del que se suponen los organismos multicelulares evolucionaron. Lo ejemplificó por medio de un dibujo de un árbol filogenético para representar la evolución que tienen los organismos por Ser descendientes de ancestros comunes, a estos las llamó “*STAMMBAÜME*” (Árbol Genealógico) (Haeckel, 1874). En la tercera edición de su libro, Haeckel da un gran salto de la evolución a la embriología donde propuso que un óvulo fertilizado podría Ser llamado como “*stem cells*”, este término lo empleó para determinar 2 premisas: el ancestro unicelular del cual todos los organismos multicelulares provienen y cómo el óvulo fertilizado da origen a todas las células del organismo.

Posteriormente el término de *STAMMBAÜME* propuesto por Haeckel fue citado por (Boveri, 1892), el cual trazó el linaje celular del *Nematodo Ascaris* ejemplificándolo por medio de un diagrama y el término *STEM CELL* para denominar una etapa intermedia entre el óvulo fertilizado y las células germinales. Boveri observó que esta célula, a la cual denominó stem cell, fue sometida a divisiones celulares asimétricas en el que una de las células hijas Se caracterizó por dar lugar al mesodermo, mientras que las otras dan origen a las células germinales. El término célula madre o stem cell era referido a lo que hoy en día empleamos para células germinales (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007)

Neumann (1868) sugirió que la médula ósea era el sitio en el cual Se formaban los componentes sanguíneos principalmente en humanos y otras especies de mamíferos. (Neumann, 1868)



En 1879, Paul Ehriliche logró la identificación de los diferentes linajes de células blancas de la sangre (Ehrilche, 1879).

Wilson, Basado en los estudios de Haeckel y Boveri, 4 años después popularizó el término stem cell en el lenguaje inglés por medio de su libro “*The cell in development and inheritance*” (Willson, 1896). De igual manera en el mismo Pappenheim, refirió el término *STAMMZELLEN* propuesto por Haeckel para describir a las células precursoras, capaces de generar tanto células blancas como rojas de la sangre (Pappenheim, 1896). Pappenheim y Ferrata expusieron y demostraron la genealogía de la hematopoyesis. (Pappenheim y Ferrata, 1910).

Maximow, Neumann, Dantschakoff, a principio del siglo XX, comenzaron a usar el término stem cell para referirse a un precursor común del linaje sanguíneo y por ende el término Stem Cells fue encontrado en publicaciones en el campo hematopoyético (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007).

A.J. Friedenstein Se le acredita generalmente por el descubrimiento de las *MeSenchymal Stem Cell* (Células Madre Mesenquimal es), comenzó sus trabajos mediante la observación crítica de un reservorio de células madre mesenquimal es provenientes del estroma de Médula Ósea (MO) adulta. Friedenstein aisló mediante la recolección de Médula ósea, demostró que esta contenía poblaciones celulares capaces de auto-mantenerse y diferenciarse en múltiples linajes celulares (Friedenstein, 2010). El mismo investigador dejó al descubierto la capacidad que tienen las células madre mesenquimal es descritas previamente como fibroblastos o células fibroblastoides, demostró que estas células eran capaces de diferenciarse hacia diferentes estirpes y una de esas son las precursoras óseas (Friedenstein, Petrakova, Kurolesova, & Fralova, 1968). A.J Friedenstein 1976 describió un tipo de célula no hematopoyética presente en la médula ósea de diferentes especies que puede formar colonias fibroblásticas *in vitro*. Estas células fueron llamadas como unidades formadoras de colonias fibroblásticas (UFC-F) y la progenie de estas fue encontrada después, por tener la habilidad de diferenciarse hacia distintas vías como lo es la osteogénica, adipogénica y condrogénica *in vitro*.



No fue sino hasta finales del siglo XIX donde el Dr. Arnold Caplan acuña el término y concepto actualmente popular “*MeSenchymal Stem Cells*”, describiendo la capa embrionaria media llamada mesodermo la cual da origen a todos los elementos esqueléticos, entre otros tejidos del cuerpo. El término mesenquimal proviene del griego y significa “en medio” (meso) y se refiere a la capacidad de las células mesenquimatosas de difundirse y migrar en el desarrollo embrionario temprano entre las capas ectodérmica y endodérmica, así promoviendo la capacidad migratoria siendo este el elemento clave de la reparación de heridas en los organismos adultos con células mesenquimal es de piel, hueso (periostio), o músculo (perimisisio)(Caplan, 1991).

Quedó demostrado que las células madre adultas pueden resultar fácil de aislar de Médula Ósea, siendo estas hasta la fecha el modelo a Seguir o “Gold standard”. Sin embargo, otros tejidos tales como adiposo, sangre periférica y pulmones, se ha demostrado que estas células poseen un prometedor potencial de proliferación y diferenciación hacia diferentes tipos celulares (Hass, Kasper, Böhm, & Jacobs, 2011).

*STEM CELLS, CÉLULAS TRONCALES O CÉLULAS MADRE.*

Las *STEM CELL* o células troncales son células no especializadas, que tienden a autoreplicarse o renovarse después de un trauma, daño o envejecimiento. Estas células muestran una habilidad para dar origen a una variedad de diferentes tipos celulares encontrados en capas embriológicas germinales (Pittenger et al., 2012).

*CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE*

Las células madre se pueden clasificar de acuerdo a su potencialidad y a su origen. En seguida se presenta la clasificación de acuerdo a su potencialidad (Smith, 2006).

TIPO DE CÉLULA	DESCRIPCIÓN
Células madre totipotentes	Estas células son capaces de formar organismos completos

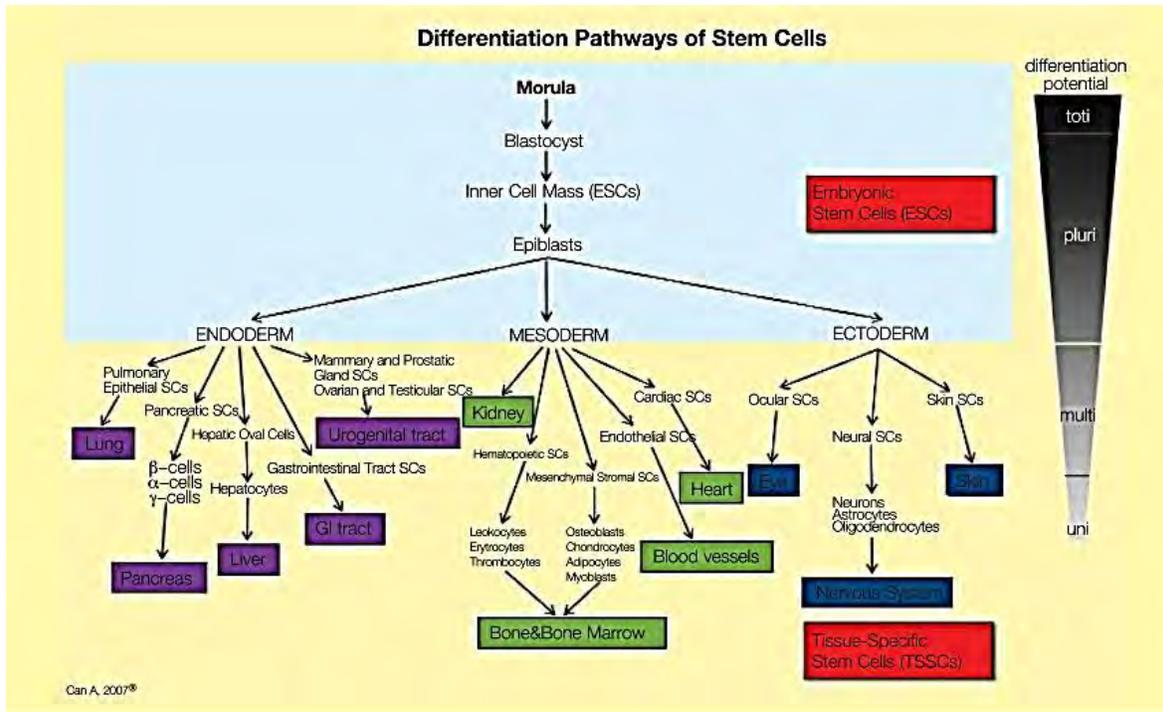


Células madre Pluripotentes	Capaces de formar todas las líneas celulares, incluyendo células germinales y muchas células extraembrionarias. Ej. Células madre embrionarias.
<b>Células madre multipotentes</b>	Capaces de formar múltiples linajes que constituyan tejidos enteros. Ej. Células madre hematopoyéticas, células madre de origen buco-dental etc.
Células madre oligopotentes	Capaces de formar 2 o más líneas celulares pero sin formar tejido. Ej. Célula madre neural
Células madre unipotentes	Forman un simple linaje como por ejemplo células madre espermatogoniales

Y de acuerdo a su origen Según el Dr. Alp Can de la Escuela Médica Universitaria de Histología y Embriología en Ankara Turquía, es la siguiente: (Can, 2008).

*Células madre embrionarias (ESC)*

*Células Madre Adultas o Tissue Specific Stem Cells (TSSC's)*



Vías de diferenciación de las células madre (Can, 2008)

### CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Para el presente estudio Se realizó énfasis en las células madre adultas, multipotentes, debido a su relativa facilidad en la obtención, su capacidad de adherencia, proliferar en cultivos y por su característica importante de diferenciarse en múltiples linajes mesenquimal es bajo condiciones controladas *in vitro* (Pittenger et al., 2012).

El término mesénquima proviene de su origen griego (meso) que significa “medio o infusión” y hace referencia a las células mesenquimatosas que proliferan y migran tempranamente en el desarrollo embrionario de las capas ectodermal y endodermal. Esta capacidad migratoria y la habilidad de relleno, son los elementos clave de la reparación de tejidos en los organismos adultos, como lo son células mesenquimal es de piel, de hueso, músculo etc. (Caplan, 1991). Las células madre mesenquimal es (MSC’s) son células madre adultas que residen en varios tejidos como médula ósea, grasa y músculo, estas células poseen la habilidad de proliferar y diferenciarse en linajes específicos de la capa germinal mesodermal (Xiao, Peperzak, van Rijn, Borst, & de Bruijn, 2010). Estas células constituyen una población heterogénea de células estromales multipotentes que proliferan *in vitro* adheridas al plástico, poseen



morfología semejante a la de los fibroblastos capacidad para formar colonias y potencial de diferenciación hacia diversos linajes (Uccelli, Moretta, & Pistoia, 2008). Morfológicamente estas células se caracterizan por poseer cuerpos pequeños, prolongaciones largas y estrechas, con apariencia fibroblastoide o ahusada, poseen núcleos prominentes, redondos, numerosas mitocondrias (Ozen et al., 2014). En conclusión, las células madre mesenquimal es son un tipo de células adultas o multipotentes, estas células poseen gran plasticidad y por ende con capacidad de diferenciación hacia linajes mesodermales, fáciles de aislar en cultivo, capaces de escapar al reconocimiento inmunológico, y potencial para aplicaciones terapéutica.

### CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Los requerimientos mínimos necesarios para que una célula sea considerada mesenquimal son los siguientes.

- Adherencia al plástico.
- Expresión de antígenos de superficie.
- Capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes

El primer requisito que estas células deben presentar es la adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo, puesto que a la observación al microscopio óptico invertido estas células deberán presentar morfología alargada, fusiforme parecida a la de los fibroblastos.

Como Segundo requisito, la presencia de un fenotipo o marcadores específicos positivos iguales o mayores a 95% y otro negativo iguales o menores al 2%, estos marcadores específicos son (Dominici et al., 2006):

<b>POSITIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>CD 75</b>	<b>CD14 o CD11b</b>
<b>CD 95</b>	<b>CD34</b>
<b>CD 105</b>	<b>CD45</b>



	<b>CD73</b>
	<b>CD90</b>
	<b>HLA-DR</b>
	<b>CD79a o CD19</b>

Siendo estos los marcadores de membrana que Según Maximo Dominicci, Señala, no obstante Se han encontrado reportes en la literatura Científica otros marcadores específicos como:

POSITIVO	REFERENCIA	NEGATIVO	REFERENCIA
<b>STRO1</b>	(Gonsalves, Lobato da Silva, Cabral, Zanjani, & Almeida-Porada, 2006)	<b>CD 14</b>	(Lee, Lee, Huang, Chang, & Lin , 2014)
<b>CD 23</b>		<b>CD 31</b>	
<b>CD 44</b>	(Ponta, Sherman, & Herrlich, 2003)	<b>CD33</b>	
<b>CD 59</b>		<b>CD49d</b>	(T. C. Lee et al., 2014)
<b>CD 73</b>	(Brohem et al., 2013; El-Sayed et al., 2014; Fawzy El-Sayed et al., 2012; Nery et al., 2013; Tan, Ahmad, Selvaratnam, & Kamarul, 2013)	<b>CD49f</b>	(T. C. Lee et al., 2014)
<b>CD 90</b>	(El-Sayed et al., 2014; Fawzy El-Sayed et al., 2012; Tan et al., 2013; F. Wang et al., 2011)	<b>CD51</b>	
<b>CD 166</b>	(T. C. Lee et al., 2014; Tan et al., 2013)	<b>CD54</b>	
<b>MHC1</b>	(T. C. Lee et al., 2014)	<b>CD71</b>	(T. C. Lee et al., 2014)



<b>ALFA-SMA</b>	(T. C. Lee et al., 2014)	<b>CD106</b>	
<b>VIMETINA</b>	(T. C. Lee et al., 2014)	<b>CD133</b>	(Lee, Lee, Huang, Chang, & Lin , 2014)
		<b>MHC II</b>	(Lee, Lee, Huang, Chang, & Lin , 2014)
		<b>CYTOKERATINA</b>	(Lee, Lee, Huang, Chang, & Lin , 2014)
		<b>DESMINA</b>	(Lee, Lee, Huang, Chang, & Lin , 2014)

Tao-Chen Lee mencionó que los mejores marcadores de membrana para la caracterización de células madre mesenquimal es en cuanto a su reactividad son los siguientes: el CD29 con  $98.51 \pm 1.21$ , CD44 con  $99.21 \pm 0.47$ , el CD59 con  $99.94 \pm 0.04$  y CD105 con  $99.28 \pm 0.34$  (T. C. Lee et al., 2014).

El tercer requisito es la multipotencialidad hacia linaje osteogénico, condrogénico, neurogénico y adipogénico y no menos importante miogénico, linaje hepático y pancreático. Estas células deben de tener la capacidad de diferenciarse hacia los linajes correspondientes mediante condiciones específicas y los inductores correctos.

LINAJE	INDUCTORES	REFERENCIA
Osteogénico	Dexametasona, $\beta$ -glicerol fosfato y Ácido Ascórbico.	(Bunnell, Estes, Guilak, & Gimble, 2008; Coelho & Fernandes, 2000; Langenbach & Handschel, 2013; McCulloch & Tenenbaum, 1986; Mostafa et al., 2012; J.-B. Park, 2012; Solchaga, Cassiède, & Caplan, 1998)



Condrogénico	Insulina, ácido, ascórbico, TGFβ1, transferrina	(Alegre Aguarón et al., 2012; Brittberg et al., 1994; Brohem et al., 2013; Bunnell et al., 2008)
Neurogénico	Ácido valproico, hidroclortisona, KCL, BHA, insulina, foskolin, mercaptoetanol, IBMX, indometacina.	(Bunnell et al., 2008; Karaoz et al., 2009; Zuk et al., 2003; Zuk, PA, 2001)
Adipogénico	Insulina, metil-isobutil-xantina, hidroclortisona, indometacina	(Brohem et al., 2013; Bueno et al., 2009; Bunnell et al., 2008; Chase, Rao, & Vemuri, 2011; Huang, Chen, Lin, Shieh, & Chan, 2008; Tan et al., 2013; Zuk et al., 2003; Zuk, PA, 2001)

PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimal es poseen ciertas cualidades o propiedades que las distinguen de las demás, las cuales son: plasticidad, capacidad inmunomoduladora y capacidad para migrar a un tejido específico (*Homing*).

PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMAL ES

Como ya se mencionó, estas células son capaces de tomar diferentes formas al tejido original tanto *in vivo* como *in vitro*. Este comportamiento celular se ha denominado como "plasticidad"(Bianco, Riminucci, Gronthos, & Robey, 2001). Este término aplica las siguientes sinonimia: metaplasia o trans-diferenciación (Maria, Khosravi, Mezey, & Tran, 2007; Tosh & Slack, 2002).

CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Al decir que las células madre mesenquimal es poseen capacidad inmunoreguladores se hace referencia a que estas células son capaces de eludir al reconocimiento del sistema inmunitario o inhibir respuestas de origen inmunitario, en principio porque inhiben la proliferación de linfocitos T (CD4 y CD8) ya que las



dejó paralizadas en la fase G0 del ciclo celular, más no las destruye. Este efecto inmunosupresor se magnifica cuando hay un contacto de célula con célula, esta atracción se lleva a cabo debido a la alta concentración de quimiocinas liberadas por el linfocito T (R. Haddad & Saldanha-Araujo, 2014). Además, inhiben la maduración de monocitos y de células progenitoras hematopoyéticas (CD34) hacia células dendríticas. Estas células dendríticas poseen un rol fundamental en la presentación de los antígenos a los linfocitos T CD4, durante la maduración de células dendríticas, estas adquieren la expresión de moléculas co-estimuladoras e incrementan la expresión de las moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de clase I y II que conforman el denominado sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) (Rodríguez, Cabrera Galván, & De León Delgado, 2015) Estas células dendríticas incubadas con células madre mesenquimal inhiben la expresión de MHC y la producción de interleucina 12 (IL-12). Disminuyen el potencial pro-inflamatorio de las células dendríticas debido a la inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) (Uccelli et al., 2008). Las células madre mesenquimal inhiben la proliferación de linfocitos B, inhiben la producción de citoquinas de estas células, al igual que inhiben la actividad citotóxica de células NK (*Natural Killers*) y su proliferación (Gebler, Zabel, & Seliger, 2012; Uccelli, Moretta, & Pistoia, 2006)

#### CAPACIDAD MIGRATORIA A TEJIDOS ESPECÍFICO (*HOMING*)

Es el proceso por el cual, las células migran a los órganos diana o sitio de lesión, dicha capacidad migratoria es dependiente de los receptores de Quimiocinas, tales como (CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR12) y moléculas de adhesión como integrin-alfa4, VCAM y ICAM, las cuales juegan un rol en la movilización de las células mesenquimal es, estas células se movilizan hacia los tejidos diana por medio de una combinación de señales moleculares del sitio de lesión dependientes a un gradiente de concentración, a este fenómeno se le conoce como quimiotaxis (Sohni & Verfaillie, 2013).

#### LOCALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Los tejidos adultos o postnatales poseen reservorios de células madre los cuales contribuyen al mantenimiento y la regeneración, estas células poseen una afinidad



por circundar los vasos sanguíneos por lo que pueden Ser consideradas como “pericitos” (Doherty et al., 1998). Estas células Se encuentran principalmente asociadas a estructuras de tejido conectivo.

Algunos de eso tejidos son los siguientes: Tejido adiposo, Médula ósea, Sangre, Hígado, Tendón, Membrana sinovial, Líquido amniótico, Sangre periférica, Sangre de cordón umbilical, músculo esquelético, gelatina de Wharton (Baksh, Song, & Tuan, 2004). Anteriormente Se mencionó la presencia de células madre en el tejido óseo ubicadas en la porción más profunda del periostio y en el endostio

Las células madre mesenquimal es provenientes de estructuras estomatológicas también son una fuente o un recurso prometedor para la obtención de este tipo de células ya que estas células multipotentes aisladas de estas fuentes primarias pueden autorenovarse y producir diferentes tipos celulares (Emoke et al., 2012). Se presenta el siguiente cuadro con los tejidos y los autores que lo han investigado.

Pulpa dental	(Gronthos, Mankani, & Brahim, 2000)
Dientes deciduos exfoliados	(Suchánek et al., 2010)
Papila Apical	(Sonoyama et al., 2008)
Folículo Dental	(Morsczeck et al., 2009, 2010)
Periostio Palatino	(Caballero, Pappa, Roden, Krochmal, & van Aaist, 2015; Emoke et al., 2012; Grimm et al., 2014)
Ligamento Periodontal	(J.-C. Park et al., 2011)
Fat Pad Bichat (bolsas de Bichat)	(Broccaioli et al., 2013)
Mucosa oral/retromolar.	(Moharamzadeh, Brook, Noort, Scutt, & Thornhill, 2015)



## CÉLULAS MADRE MESENQUIMAL ES PROVENIENTES DE MÉDULA ÓSEA

Para el presente estudio Se hizo énfasis en las células madre provenientes de médula ósea obtenidas de la porción distal de fémur de conejos. Como ya Se ha demostrado en la literatura científica, el recurso más común de obtención de células madre mesenquimales es la médula ósea debido a que genera un número sustancial de células madre mesenquimales (Gudleviciene, Kundrotas, Liudkeviciene, Rascon, & Jurga, 2015). Esta células Se obtienen en cultivos por medio de técnicas de centrifugación de densidad de gradientes (Bourzac et al., 2010; Y. Chen et al., 2014; Choi et al., 2008; Gudleviciene et al., 2015; Hideki, 2013; Morandi et al., 2008; Pereira-Junior, Rahal, Lima-Neto, Landim-Alvarenga, & Monteiro, 2013; Perez-Basterrechea, Obaya, Meana, Otero, & Esteban, 2013; Pierini et al., 2012; Piñero Eça et al., 2009; Stanko, Kaiserova, Altanerova, & Altaner, 2014; Tan et al., 2013; Taylor & Clegg, 2011; S. Zhang et al., 2010; W Zhang et al., 2014; Weidong Zhang et al., 2014). La médula ósea, también llamada tejido medular, es el tejido hematopoyético primario del quinto mes del desarrollo fetal. Se encuentra en la cavidad central de huesos largos y axiales, compuesta principalmente por islas de tejido hematopoyético y grupos de células adiposas rodeados de Senos vasculares intercalados dentro de una malla de hueso trabecular. La médula ósea es el mayor órgano hematopoyético el cual corresponde el 5% del peso total en humanos y primario de tejido linfoide, responsable de la producción de eritrocitos, los encargados en trasportar el oxígeno a los tejidos, granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinofilos), monocitos, linfocitos y las derivadas de los megacariocitos denominadas plaquetas, encargadas de prevenir sangrados. También contienen células madre tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas de las cuales son los osteoblastos y los osteoclastos respectivamente originarios.

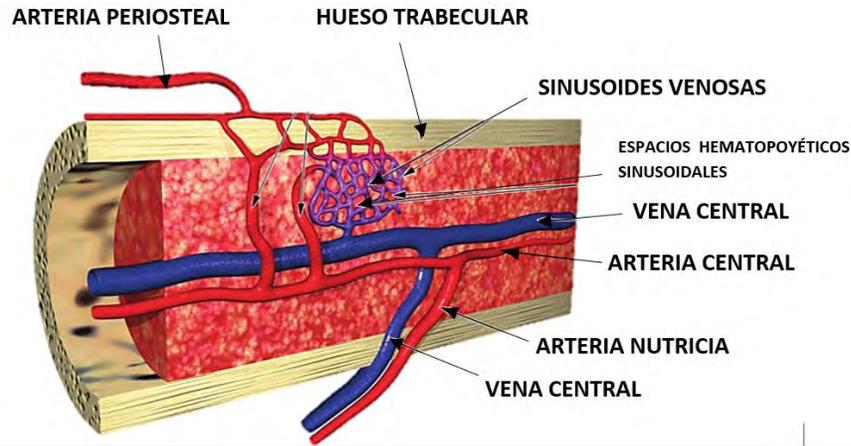
La médula ósea se puede clasificar en 2:

- Médula ósea roja
- Médula ósea amarilla



Se hace referencia a la médula ósea roja o médula ósea activa, al lugar donde se produce la hematopoyesis o tejido hematopoyético y la médula ósea amarilla, todo lo que comprende el tejido adiposo, la cual no produce células sanguíneas (GUREVITCH, SLAVIN, RESNICK, KHITRIN, & FELDMAN, 2009). La superficie del tejido medular está rodeado por una cubierta de tejido óseo trabecular, las superficies tanto la superficie interior de las cavidades óseas y la superficie exterior de las espículas de hueso esponjoso dentro de las cavidades están cubiertas por un revestimiento endosteal que consta de una sola capa de células óseas planas, soportados por una capa delgada de tejido conectivo reticular. Los osteoblastos y osteoclastos se encuentran también dentro del revestimiento del endostio, a esto se le puede considerar como una especie de forro (Travlos, 2006; Wilkins, 1992). Se presenta una red de sinusoides a través de los espacios trabeculares, al igual que las venas y arteriolas las cuales tienden a quedar hacia los centros de los espacios intertrabeculares. La trabécula, arteriolas, y vénulas forman una especie de armazón circundante en la cual se lleva a cabo la granulopoyesis, la eritropoyesis y la megacariocitopoyesis se lleva a cabo en las ramificaciones de los sinusoides (Wilkins, 1992).

El suministro sanguíneo óseo y de la médula ósea está directamente conectado por medio de sinusoides venosas en la médula que reciben sangre arterial de arterias nutricias del hueso y por las redes de capilares periósticos que por último están conectados con las sinusoides a través de los canales Haversianos, la médula ósea no posee un drenaje linfático



Travlos, 2006

A la médula ósea se le puede clasificar en 2 partes; en estroma medular, componentes celulares.

#### ESTROMA MEDULAR.

La palabra Estroma proviene del griego, que significa “sustrato físico” o algo sobre el cual se reposa o descansa.

El estroma medular está compuesto por una población celular heterogénea que provee de estructura y soporte fisiológico de células hematopoyéticas.

El estroma consiste en adipocitos (hasta un 75% del total de la médula ósea roja), macrófagos, y tejido conectivo reticular compuesto por células reticulares y fibras reticulares (colágeno tipo III).

En este estroma medular están incluidas todas las especies de células que se encuentran entre las superficies ósea exteriores de los vasos sanguíneos, las superficies óseas que se encajona al espacio hematopoyético, y aquellas que no son del linaje hematopoyético, se incluyen: adipocitos medulares, células de linaje óseo (osteoblastos inactivos), y células osteoblásticas (Krebsbach, Kuznetsov, Bianco, & Gheron Robey, 1999).

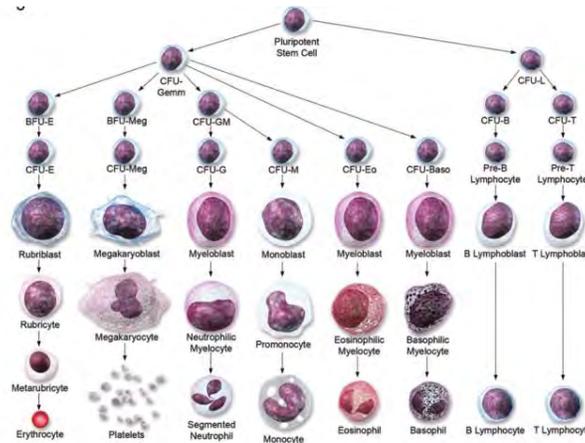
#### COMPONENTES CELULARES

Los principales componentes celulares que se encuentran en la médula ósea son células adiposas, maduración de células hematopoyéticas tales como:

1. Granulopoiesis
2. Monopoiesis
3. Eritropoiesis
4. Megacariopoiesis
5. Y otras células presentes regularmente en la médula ósea normal como:  
linfocitos, células de plasma, mastocitos.

Los procesos de maduración para linaje hematopoyéticos mencionados, son llevados a cabo por medio de precursores hematopoyéticos conocidos como Células Madre (*Stem Cells*) Pluripotentes. Estas células poseen dos funciones primarias: mantener su número por medio de procesos de replicación y renovación y en Segundo lugar tiene la capacidad de dar origen a todo el linaje hematopoyético.

Estas células se encuentran en mayor número periféricamente cerca de las células de revestimiento del hueso (Travlos, 2006).



(Gurevitch, Slavin, Resnick, Khitrin, & Feldman, 2009).

Dentro de ese microambiente hematopoyético en los periodos postnatales, el microambiente hematopoyético principalmente es el que se encuentra en huesos largos, el cual progresivamente será remplazado por células mesenquimales, las cuales son las precursoras del microambiente hematopoyético de hueso y de tejido graso, estas se encuentran junto con las células mesenquimales y forman el endostio y la superficie trabecular, estas células madre mesenquimales se presentan



el 1% del número total de células mononucleares provenientes de médula ósea (Gurevitch et al., 2009).

### ANDAMIOS O MATRICES SINTÉTICAS

Las matrices sintéticas o andamios forman un parte sustancial dentro de la ingeniería de tejidos, típicamente elaborados por biomateriales poliméricos, los cuales proveen de soporte estructura tridimensional temporal para la adherencia celular y el subsecuente desarrollo tisular, el mejor andamio para la ingeniería de tejidos Será aquel que proporcione una matriz extracelular indicada para el tipo de tejido al que Se pretende imitar o igualar, entre otras características tales como:

1. Arquitectura o la habilidad de Ser moldeado en diferentes formas con estructuras porosas.
2. Bioactividad, adecuación para la viabilidad, crecimiento y diferenciación celular dentro del andamio.
3. Propiedades Mecánicas al sitio donde Se pretende implantar.
4. Biodegradabilidad para que el tejido sustituya en un tiempo determinado al andamio
5. Recientemente Se ha dado mayor consideración a aquellas cuyas características proporcionen una mínima reacción antígeno-anticuerpo, de naturaleza antibacterial intrínseca , no carcinogénica ni mutagénica (Chan & Leong, 2008).

Partiendo de este punto existen un gran número de materiales ya Sean orgánicos e inorgánicos o sintéticos que han sido sugeridos para participar en la Medicina Regenerativa y para este caso en Ingeniería de tejidos óseo s de los cuales, los sintéticos más comunes son: Poli- $\epsilon$ -Caprolactona (Rampichová et al., 2013) Poli-Láctico (McCullen et al., 2009) y los orgánicos más comunes son a base de geles, colágeno y Quitosano (Di Martino, Sittinger, & Risbud, 2005; Khor & Lim, 2003; Levengood & Zhang, 2014; Muzzarelli et al., 1994; G. Wang et al., 2011; Yu et al., 2007).



## QUITOSANO/POLI-L-LISINA

El Quitosano es un polímero natural (polisacárido) que se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina bajo condiciones alcalinas, es el Segundo biopolímero natural más abundante, es un homopolímero encontrado en los exoesqueletos de conchas de los crustáceos marinos (artrópodos) y paredes celulares de los hongos, posee una naturaleza catiónica que es la responsable de la interacción electrostática con glicosaminoglicanos (GAG), presentes en la matriz extracelular, estas juegan un papel fundamental en la organización y su funcionamiento (Di Martino et al., 2005). Es un análogo de los glicosaminoglicanos, lo que le proporciona algunas de sus características biológicas, y a diferencia de los GAG, este presenta carga positiva por lo que le permite interactuar con la superficie de las células. Gracias a sus características físico-químicas, el quitosano presenta una gran plasticidad ya que puede ser empleado o adaptado en membranas, hidrogeles y fibras (Amaral, Lamghari, Sousa, Sampaio, & Barbosa, 2005; Florczyk et al., 2013; Muzzarelli et al., 1994).

El Quitosano posee principalmente características biocompatibles, una baja o nula toxicidad, es un material biodegradable, está demostrado que promueve la osteogénesis y la actividad angiogénica (Hu, Li, Wang, & Shen, 2004). El Quitosano posee la capacidad de ser degradado *in vivo* por medio de una enzima proteolítica presente en casi todos los tejidos del cuerpo humano, llamada lisozima, esta enzima degrada al polisacárido y descompone en oligosacáridos los cuales no presentan ningún riesgo y pueden ser fácilmente degradados por otras enzimas y reabsorbidos por el mismo organismo (Rao & Sharma, 1997). La poli-L-Lisina es un polímero de carga positiva, conocido por su gran capacidad de proporcionar adherencia y crecimiento celular (Zheng et al., 2008).

## 4. JUSTIFICACIÓN.

Las lesiones de origen músculo esqueléticas hoy en día son comunes y presentan una carga considerable de salud mundial, sin embargo los datos de incidencia



basados en la población son insuficientes, Según el Dr. Terje Meling jefe del departamento de Cirugía Ortopédica del Hospital Universitario Stavenger en Noruega y colaboradores la incidencia de fracturas de huesos largos son:

	Menores a 16 años	Mayores o iguales a 16 años
Incidencia de fractura	20 %	80%
Edad	10 años (10-13)	70 años (50-84)
Género	Hombres (30%) Mujeres (13%)	Hombres (70%) Mujeres (87%)
Lado izquierdo/derecho	Derecho (19%) Izquierdo (21%)	Derecho (81%) Izquierdo (79%)
Tipo de hueso	Metafiseal (15%) Diafiseal (47%)	Metafiseal (85%) Diafiseal (54%)
Miembro superior /inferior	Superior (41%) Inferior (6%)	Superior (59%) Inferior (94%)
Fractura cerrada o expuesta	Cerrada (20%) Expuesta (16%)	Cerrada (80%) Expuesta (84%)
Mantenimiento de la fractura	Sin fijación (77%) Con fijación (9%)	Sin fijación (23%) Con fijación (91%)



Según, Meling, Harboe y Soreide en el 2009 los Segmentos más fáciles a fracturarse son los tobillos y los Segmentos proximales humerales (Meling, Harboe, & Soreide, 2009). Otro estudio en la Unidad de Trauma y Ortopedia de Edimburgo en el 2006 demostraron que las porciones con más tendencia a fracturarse son la porción radial distal, metacarpales y los Segmentos femorales proximales (Court-Brown & Caesar, 2006).

De acuerdo con los datos de los Miembros del Consejo Consultivo de la Asociación Mexicana de Medicina y Cirugía del Trauma en el 2003 Se cubrieron un total de 345,371 Servicios de atención médica prehospitalaria de urgencia relacionados con pacientes traumatizados, por ejemplo tan sólo en el hospital Español de la ciudad de México de este total, el 31% son accidentes automovilísticos (Illescas Fernández, 2003). Esto nos sugiere que en nuestra población las alteraciones óseas, de tipo traumáticas presentan un problema epidemiológico severo. Ante esta situación demandante, el presente estudio pretende establecer y estandarizar las estrategias metodológicas donde los alumnos instruidos y supervisados, apoyen a los expertos en el área, en el que ambos se vean beneficiados y sean capaces de llevar a cabo perfectamente los procedimientos de cultivo celular, técnicas de viabilidad celular, proliferación celular, entre otras. Este estudio también busca establecer alternativas que superen las expectativas a las terapias convencionales por medio de técnicas novedosas o innovadoras con la manipulación de matrices tridimensionales o andamios que favorezcan la adherencia y proliferación celular, siendo el Quitosano con Poli-L-Lisina el andamio propuesto en el presente proyecto por las características que posee en conjunto con células madre mesenquimales.

Esto representa un reto para cirujanos e investigadores, el “biomaterial ideal” para la regeneración de defectos óseos de tamaño crítico, y su aplicación primeramente en conejos de Raza Nueva Zelanda, y a mediano plazo, sea aplicado en casos clínicos controlados en seres humanos con el objetivo de que la ingeniería de tejidos trascienda para bien de la sociedad.



## **5. HIPÓTESIS ALTERNA.**

El constructo tisular con células de médula ósea de fémur regenerará el defecto óseo.

## **6. HIPÓTESIS NULA.**

El constructo tisular con células de médula ósea de fémur no regenerará el Defecto óseo.

## **7. OBJETIVO GENERAL.**

-Comparar la regeneración de defectos óseos en Radio de conejos con células de médula ósea de fémur contra grupo control.

## **8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Estandarización de técnicas de cultivo celular
2. Estandarización de las técnicas de viabilidad, proliferación celular
3. Estandarizar técnicas de purificación celular.
4. Establecer colonias purificadas de células madre mesenquimales de médula ósea.
5. Estandarizar técnica de Inmunofenotipificación por medio de marcadores específicos de membrana CD44 positivo y CD34 negativo
6. Comparar por medio de radiografías preoperatoria transoperatoria y postoperatoria, las imágenes de los procesos de regeneración ósea
7. Evaluar la neo-formación ósea por medio de la interpretación de la Tomografía Axial Computarizada.
8. Evaluar la adhesión celular por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM).
9. Evaluar la regeneración ósea por medio de tinción histológica (H&E),



## 9. METODOLOGÍA.

### 1. SELECCIÓN DE CONEJOS.

Los 3 conejos hembra, fueron adquiridos en el Modulo de Cunicultura de Centro de Producción y Estudios Agropecuarios de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; fueron trasladados al Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala el día 1 de Diciembre del 2014.

A la llegada al Bioterio fueron aclimatados en un lugar especial donde fueron colocados en jaulas individuales y acondicionadas para su estancia. Alimentados a base de Conejina (ABIN CK Purina) y agua purificada.

### 2. ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICA OBTENCIÓN DE MÉDULA ÓSEA DE FÉMUR.

#### 2.1 ANESTESIA DE LOS CONEJOS

#### MATERIAL

- Báscula
- Ketamina (ANESKET PiSA) 1000mg/10ml
- Xylacina (Procin Equus PiSA) 10 mg
- Jeringas con agujas de 3 y 5 ml
- Jeringas de insulina

#### PROCEDIMIENTO

- A. Previamente se tomaron los datos de peso de cada conejo, con el fin de inducirlos a una anestesia general.
- B. Dependiendo del peso de los conejos, se obtuvo las dosis tanto de anestésico como relajante muscular con los datos proporcionados por el fabricante.
- C. El anestésico utilizado, Ketamina de 100 mg/10 ml (Anesket), administrado por vía intramuscular, 50 mg por kg de peso del conejo y Xylacina como relajante muscular de 10 mg por kg de peso.
- D. Se administró primeramente el anestésico en glúteo derecho, Seguido del relajante muscular inyectado en glúteo izquierdo.
- E. El tiempo de espera en hacer efecto del anestésico fue alrededor de 10 minutos.



- F. Se trasladaron uno por uno a quirófano, verificando previamente los reflejos pedales y palpebrales para cerciorar la anestesia general del conejo.

## 2.2 TÉCNICA DE ASPIRADO MEDULAR

### MATERIAL

- Campos operatorio de tela
- Clorhidrato de Benzalcolio.
- Gasas estériles
- Terramicina en gel (PFEIZER)
- Cinta micropore
- Aguja tipo Ossgood (18 G x 3.3 cm TROKAR)
- Agujas de 5 ml y 3 ml
- Cartucho de lidocaína

### PROCEDIMIENTO

- A. Se colocó al conejo recostándolo en posición decúbito lateral tanto izquierdo o derecho o también conocida como posición de Sims o posición de Semiprono.
- B. Se realizó asepsia y antisepsia de la zona a puncionar con Clorhidrato de Benzalcolio.
- C. Para evitar la opacidad corneal, se colocó Terramicina en gel (PFEIZER) en cada ojo y los párpados Se mantuvieron cerrados con micropore, evitando la salida del medicamento.
- D. Mediante palpación se ubicó la porción móvil distal de la epífisis femoral para realización de punción.
- E. Se administró lidocaína simple en zona a intervenir para mejorar los rangos de anestesia.
- F. Se colocó aguja tipo Ossgood en la zona a puncionar, aplicándose presión sobre la aguja, a través del plano cutáneo, celular subcutáneo, músculo y periostio



hasta atravesar la lámina ósea, hasta Sentir un vacío, esto significa que ya Se ha perforado la cavidad medular.

- G. Se retiró la cánula de la aguja ubicado en la porción superior y se insertó una jeringa de 5 ml en el émbolo de la aguja tipo Ossgood.
- H. Se aspiraron lentamente alrededor de 3 a 5 ml del contenido medular.
- I. Posteriormente se retiró la aguja y se verificó que no existiera hemorragia de la zona intervenida, realizando hemostasia con presión digital y una gasa.

### 2.3 DEPÓSITO DE LA MUESTRA

#### MATERIAL

Tubos BD Vacutainer (K2 EDTA 10.8 mg de 6.0 ml) de tapa color lila.

#### PROCEDIMIENTO

- A. La muestra obtenida fue colocada inmediatamente en tubos BD Vacutainer de tapa color lila.
- B. Se mantuvieron en movimientos oscilantes para su homogenización con el fin de que la muestra de médula ósea no Se coagule por toda la presencia de elementos sanguíneos que posee en su fórmula.
- C. Se dejó reposar a temperatura ambiente 24°C aproximadamente.

### 2.4 POSOPERATORIO

#### MATERIAL

- Penicilina Benzatinica (Benzetacil) 1,200, 000 U. Suspensión.
- Ácido Acetilsalicílico (Aspirina Efervescente) 400 mg Tabletas efervescentes.
- Campos operatorios de tela

#### PROCEDIMIENTO

- A. Después del aspirado medular, los conejos fueron abrigados o envueltos en campos operatorios con el fin de mantener su temperatura corporal (36.5°C) y no caigan en hipotermia,



- B. Se les administró intramuscularmente Antibiótico: Benzatina Bencilpenicilina (Benzetacil) 1,200, 000 U. Suspensión. Administración única
- C. Analgésico: Ácido Acetilsalicílico (Aspirina Efervescente) 400 mg Tabletas efervescentes. Administración por 2 días.

### 3. TÉCNICA DE CULTIVO CELULAR DE MÉDULA ÓSEA.

#### MATERIAL

- Tubos de 15 ml estériles
- DPBS (SIGMA-ALDRICH)
- Máquina de centrifuga (SIGMA MODELO 2.15 KL)
- Campana de flujo laminar (TELSTAR BIOADVANCED II)
- Propipeta o Pipeteador (S1 Pipet Filler THERMO SCIENTIFICS)
- Micropipetas (10, 100, 1000  $\mu$ l BOECO)
- Pipetas Serológicas (TPP)
- Pipetas tipo Pasteur
- Puntas para Micropipetas (BIOLOGIX)
- Cajas de cultivo estéril de  $25\text{cm}^2$  Tipo falcón (Nunclon™ Surface).
- Gasas estériles
- Medio de cultivo DMEM (BIOWEST)
- SFB (suero fetal bovino, BIOWEST)
- Solución antibiótico-antimicótico (SIGMA-ALDRICH)

#### **PROCEDIMIENTO**

- A. Por medio de una gasa estéril se filtró el contenido del tubo Vacutainer pasándose a un tubo de punta cónica de 15 ml estéril
- B. Se lavó con *phosphatase-buffered-saline* (PBS) con un pH de 7.4 (tubo “a”)
- C. Se centrifugó 1000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente, colocando tubos de manera equidistante a la muestra con el fin de que haya un correcto balance.
- D. Ya obtenido el pellet celular se retiró cuidadosamente los excedentes de PBS ubicados en la porción superior de la muestra



- E. Por medio de una pipeta de transferencia (BIOLOGIX) se succionó entre las dos primeras partes (interfase o anillo celular), cuidando de no recolectar nada de la muestra inferior y se colocó en otro tubo de punta cónica estéril (tubo “B”)
- F. Se llevó a centrifugación (Segunda centrifugación) a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- G. Se retiró el excedente de PBS y Se volvió a recolectar la interfase pasándose a otro tubo de punta cónica estéril (tubo “C”)
- H. La muestra final ya centrifugada se re-suspendió en 1 ml de medio DMEM
- I. Se sembró en un frasco de cultivo estéril de 25cm<sup>2</sup> tipo falcón.
- J. Fue dejado incubar por 10 a 15 minutos para lograr la adherencia celular a la caja de cultivo a 37° C con 95% de oxígeno y 5 % de CO<sub>2</sub>.
- K. Pasado este tiempo Se le adicionó medio de cultivo DMEM suplementado con 20% de SFB y 1% de solución antibiótico-antimicótico
- L. El medio de cultivo fue cambio pasadas las primeras 24 horas, con el fin de eliminar las células no adherentes de origen sanguíneo, después Será remplazado cada 2 veces por semana.

#### 4. COSECHA Y SIEMBRA CELULAR.

##### **MATERIAL**

- tryPLE™ Express (SIGMA-ALDRICH)
- Incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de oxígeno (Binder modelo CB150UL)
- DPBS (SIGMA-ALDRICH)
- Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium, BLOWEST), enriquecido con 20% de SFB (Suero Fetal Bovino, BLOWEST), 100 UI/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de Anfotericina B (SIGMA-ALDRICH)
- Propipeta o Pipeteador (S1 Pipet Filler THERMO SCIENTIFICS)
- Pipetas Serológicas (TPP)
- Microscopio óptico invertido (LEICA modelos MIL LED)
- Campana de flujo laminar (TELSTAR II BIOADVANCE)
- Tubos de 15 ml estériles de punta cónica



- Máquina de centrifuga (SIGMA MODELO 2.15 KL)
- Cajas de cultivo estéril de 75 y 125 $cm^2$  Tipo falcón (Nunclon™ Surface).

### **PROCEDIMIENTO**

- A. Una vez llegado a un estado de confluencia del 80% fue necesario realizar los pases celulares, con el fin de ampliar el cultivo y que las células no entren en estado de apoptosis.
- B. Se retiró el medio de cultivo de la caja de 25  $cm^2$
- C. Se le adicionó de 5 ml de trypLE™ Express (SIGMA-ALDRICH) a las cajas de cultivo.
- D. Se colocó en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de oxígeno a 37°C durante 5 minutos.
- E. Es importante después de haber separado las células, detener la acción enzimática del trypLE Express colocando 5 ml de DMEM, observándose al microscopio para verificar de la correcta cosecha celular.
- F. Una vez realizada la cosecha celular, esta fue recuperada con una pipeta estéril para Ser colocada en tubos de 15 ml.
- G. Los tubos de punta cónica de 15 mL con las células fueron llevados a centrifugación durante 10 minutos a 1000rpm y con una temperatura ambiente.
- H. Posteriormente se retiró cuidadosamente el sobrenadante para obtención del pellet o botón celular.
- I. Se re-suspendió el pellet en 1 ml de medio DMEM
- J. Finalmente, Se vertió el concentrado de esta suspensión celular en cajas de cultivo expandiéndola sobre toda la caja de cultivo correspondiente como se plantea en el siguiente cuadro:

<b>TAMAÑO DE CAJA DE CULTIVO</b>	<b>ML DE MEDIO DE CULTIVO</b>
<b>CAJA DE 25 <math>cm^2</math></b>	5 ml
<b>CAJA DE 75 <math>cm^2</math></b>	20 ml
<b>CAJA DE 125 <math>cm^2</math></b>	30 ml



- K. Se realizaron las evaluaciones de morfología celular mediante microscopía invertida.
- L. Para la realización de las diferentes pruebas que posteriormente serán mencionadas a continuación fue necesario después de separarlas, tomar un concentrado de 100 microlitros y sembrarlas en los pozos correspondientes.

#### 5. MÉTODO DE SEPARACION CELULAR (MACS) MAGNETIC ACTIVE CELL SOURTING.

La purificación celular por medio de MACS posee su característica, en que las células tienen marcadores de membrana específicos. Estos son etiquetados magnéticamente por medio de anticuerpos conjugados con microperlas, las cuales son usadas para identificar magnéticamente la población celular que se desea purificar, la columna por donde se hace pasar la suspensión celular contiene perlas de hierro y esta columna colocada sobre un magneto, provocando que las células diana se retengan dentro de la columna por el campo magnético existente y las células no etiquetadas no serán retenidas (El-Sayed et al., 2014; Makker, Agarwal, & Sharma, 2008)

#### MATERIAL

- DPBS (SIGMA-ALDRICH)
- EDTA (J.T BACKER)
- BSA (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)
- Trypan blue solución 0.4% (SIGMA-ALDRICH)
- Cámara de Neubauer
- Parafilm
- Material para cosecha celular
- CD44 human microbeads (MILTENYI BIOTEC)
- Columnas (XS SuperMACS II MILTENYI BIOTEC))
- MACSxpress Separator (MILTENYI BIOTEC)
- MACS MultiStand (MILTENYI BIOTEC)
- Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, BIOWEST), enriquecido con 20% de SFB (Suero Fetal Bovino, BIOWEST),





- Cubreobjetos
- Azul Trypan

### **PROCEDIMIENTO**

- Colocando un cubreobjetos encima de la cámara de Neubauer
- Entre la cámara de Neubauer se colocó la suspensión celular con el azul Trypan (10µl)
- Se contó únicamente un solo cuadrante, en el que las células se hayan en dicho espacio.
- Se cuenta el número de células vivas.
- Ese número se multiplica por 10,000 para calcular los mililitros.
- Se dividió entre el número de cuadrantes (4).
- Se multiplicó por 2 esto justifica los 10 µl de azul Trypan y los 10 µl.
- Se multiplicó por 5 para calcular los 5 ml
- En la cámara de Neubauer se contó únicamente un solo cuadrante

$$\frac{\# \text{ de células}}{4} (2)(5)$$

### 5.2 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN CELULAR POR MAGNETIC ACTIVE CELL SORTING

#### **PROCEDIMIENTO**

- Fórmula para preparar buffer de separación

80 µl de buffer de Separación por cada 10, 000,000 de células.

Se hace por regla de 3

80 µl – 100, 000, 000

X - # de células



B. Fórmula para CD44

20  $\mu$ l de CD44 por cada 10, 000, 000 de células.

20  $\mu$ l – 10, 000, 000

X - # de células contadas

C. Una vez obtenidos los calculas Se preparó tanto el buffer de Separación y el CD 44

D. Se le agregó el buffer y el CD 44 y Se re suspendió todo.

E. Se dejó incubar en frio de 2 a 8 °C durante 15 minutos

F. Se colocaron 2 ml de buffer de Separación a la muestra previamente incubada.

G. Se re suspendió y Se centrifugó a 1000 RPM, 10 minutos a temperatura ambiente.

H. Una vez obtenido el pellet Se retiró el sobrenadante y Se colocan 500  $\mu$ l por cada 10, 000, 000 de células y Se re-suspende.

I. Se colocaron las columnas (XS SuperMACS II) en los imanes de ambos lados.

- Se introducen de tal manera que las pestañas queden de frente y Se colocan los tubos de punta cónica de 15 ml debajo de las columnas.

J. Se colocaron 3 ml de Buffer de Separación en las columnas (XS SuperMACS II).

K. Se fue depositando ml por ml de modo que no Se sature la columna.

L. Se fue depositando la suspensión celular en las paredes de la columna

M. Una vez que ya Se haya filtrado toda la suspensión, Se retiró con mucho cuidado la columna del imán.

N. El restante Se inyectó sobre el tubo de 15 ml.

O. Se re suspendió con DMEM.

P. Se sembró en caja de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> sobre toda la extensión de la caja falcón.

Q. Se observaron en microscopio óptico invertido

R. Se colocaron 5 ml de DMEM a la caja de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>

S. Se metió a incubación 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de oxígeno a 37°C

Para las siguientes pruebas fue necesario hacer siembra de las células a evaluar en caja con pocillos, dependiendo del ensayo es la caja de pozos que se emplea.



## 6. SIEMBRA DE CÉLULAS EN POZOS

### MATERIAL

- Caja de 6, 24, 96 pocillos (dependerá del ensayo que se pretenda hacer)
- Portaobjetos

### PROCEDIMIENTO

- Ya establecido el conteo celular Se Sembraron las células, un aproximado de 100 microlitros de suspensión celular por pozo.
- Se colocó portaobjetos en el fondo del pozo con cuidado de no fracturarlo.
- Se colocaron las células en portaobjetos
- Se dejaron 5 minutos que las células se adhieran al portaobjetos.
- Pasados los 5 minutos de les colocó medio DMEM
- Se metieron a incubación

## 7. ENSAYOS DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR.

Se realizaron las siguientes pruebas de viabilidad y proliferación celular a 1, 3, 7 y 14 días con las siguientes pruebas con sus respectivos controles negativos.

PRUEBAS DE VIABILIDAD	PRUEBAS DE PROLIFERACIÓN
AZUL TRIPAN	MTT
LIVE/DEAD	ALAMAR BLUE
	CFU-F

### 7.1 MÉTODO DE VIABILIDAD POR TRYPAN BLUE SOLUTION 0.4% (SIGMA-ALDRICH)

#### MATERIAL

- material para cosecha celular
- Trypan Blue Solución 0.4% (SIGMA-ALDRICH)
- Cámara de Neubauer
- Microscopio óptico invertido (LEICA modelos MIL LED)



## PROCEDIMIENTO

- A. Se determinó por tinción Trypan blue solución (0.4%)
- B. Se retiró el medio de cultivo DMEM de las cajas de cultivo
- C. Las células fueron cosechadas añadiéndoles 5 ml del TrypLE Express
- D. Se dejaron incubar por 5 minutos 37° C, 5 % CO<sub>2</sub>
- E. Se le colocó 5 ml medio DMEM para inactivar la enzima del TrypLE EXPRESS
- F. El sobrenadante fue recuperado con una pipeta volumétrica estéril para ser colocado en tubos de 15 mL
- G. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000rpm a temperatura ambiente.
- H. Se obtuvieron 50 µl de la suspensión celular y Se incuba en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- I. Se colocó a una concentración 1:1 10 µl de suspensión celular y 10 µl 0,5 % de azul Trypan
- J. Se re-suspendió el pellet celular.
- K. Se tomaron 10 µl de la suspensión celular de los 50µl aproximadamente.
- L. La suspensión deberá Ser homogeneizada e incubada durante 30 minutos a 4°C
- M. Se llevó a cámara de Neubauer y por medio de un microscopio óptico invertido Se observó y cuantificara las células
- N. Se contó las células viables y las no viables para obtener así el total de número de células viables por medio de la siguiente formula:

$$\frac{\# \text{ de células}}{4} (2)(5)$$

### 7.2 ENSAYO LIVE/DEAD (LIFE TECHNOLOGIES)

El kit LIVE/DEAD proporciona un ensayo de viabilidad celular de fluorescencia de 2 colores (rojo y verde)



Este ensayo Se basa en la determinación simultánea de las células vivas y muertas por medio de 2 pruebas

- a. Por medio de la actividad esterasa intracelular
- b. Integridad de la membrana plasmática.

Sus principales componentes son 2:

- c. Calceina AM
- d. Homodímero de etidio

La Calceina AM, que no es fluorescente es absorbida por las células vivas siendo transportado a través de la membrana celular.

La actividad de las enzimas esterases transforma la calceina AM en calceina fuertemente fluorescente.

Esta calceina fuertemente fluorescente es retenida por las células vivas y esto provoca que flouresca intensamente de color verde.

El Homodímero de etidio penetra en las células con daño en la membrana y aumenta su fluorescencia tras unirse a ácidos nucleicos.

Produciendo de esta manera una fluorescencia de color rojo brillante en las células muertas.

#### Material

- DPBS (SIGMA-ALDRICH)
- LIVE/DEAD KIT VIABILITY/TOXYCOLOGY INVITROGEN
- Caja de 6 pocillos
- Microscopio de fluorescencia ZEISS HXP 120 C con el programa ZEN lite 2012.

#### **PROCEDIMIENTO**



A. Preparación de solución

997.5  $\mu$ l de PBS

0.5  $\mu$ L de Calceina

2  $\mu$ L Homodímero de etidio-1

1000  $\mu$ L en total

B. Se sembraron las células en caja de 24 pocillos

C. El ensayo fue evaluado para 3, 7, 14 días en pozos diferentes cada una.

D. Primeramente Se retira el medio basal DMEM

E. Se lavaron las muestras 2 veces con PBS

F. Se colocaron 300  $\mu$ l de la solución de L/D por muestra.

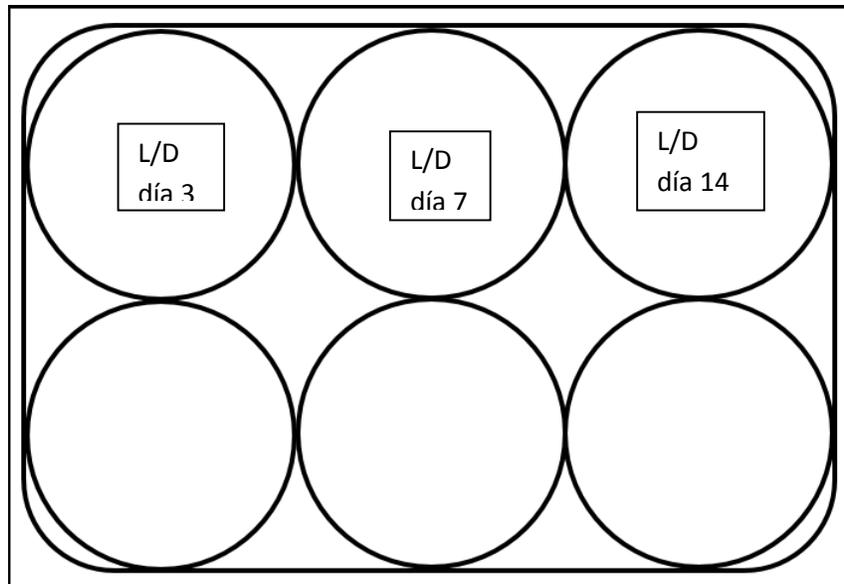
G. Es importante recubrir los pocillos con papel aluminio

H. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

I. Pasado el tiempo Se realizaron las observaciones en microscopio de fluorescencia con el programa ZEN lite 2012.

J. A la observación microscópica de fluorescencia las células vivas muestran fluorescencia color verde.

K. A la observación microscópica de fluorescencia las células muertas o no viables muestran fluorescencia color roja.



### 7.3 ENSAYO DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) SIGMA-ALDRICH

Es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en Secuencias de ADN, es utilizado ampliamente en la microscopía de fluorescencia, siendo este un marcador nuclear.

#### **PROCEDIMIENTO.**

- A. Se retiró el medio de cultivo por medio de una punta de Micropipetas de 1000  $\mu$ l (BIOLOGIX) y micro-pipeta de 100-1000  $\mu$ l (LABNET)
- B. Se colocaron 2  $\mu$ l de DAPI (SIGMA-ALDRICH) por muestra
- C. Se le adicionó papel aluminio sobre toda la caja de 24 o 96 pocillos.
- D. Se dejó Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- E. Se observó a través de microscopio de fluorescencia (ZEISS HXP 120 C)
- F. Las lecturas se realizaron con el programa ZEN lite 2012.
- G. Fueron realizados 3 ensayos a partir de 3, 7, 14 días respectivamente.



#### 7.4 ENSAYO CFU (COLONY FORMING UNITS) COLONIAS CLONOGÉNICAS.

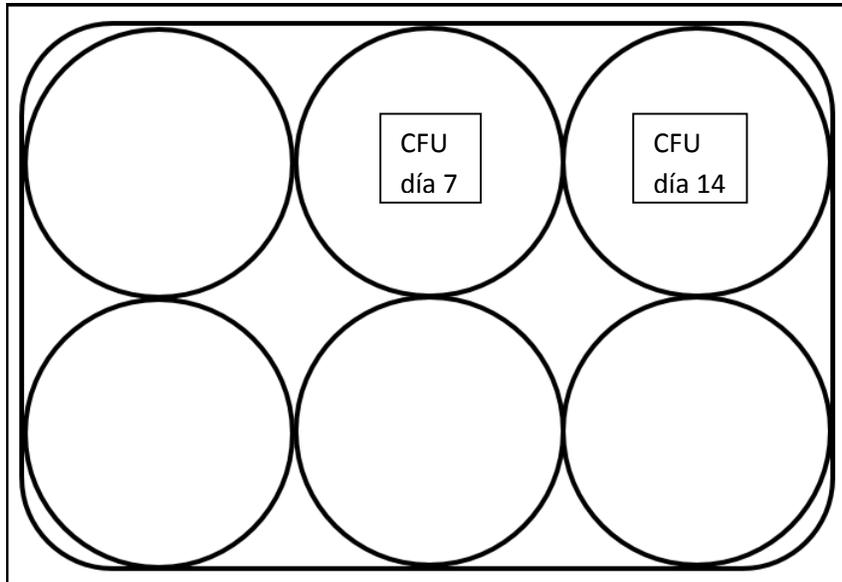
En esta prueba, el azul de toluidina posee una afinidad por los ácidos nucleicos, por lo tanto se une a los componentes nucleares de los tejidos con un alto contenido de ADN y ARN.

Material.

- Caja de 6 pocillos (CORNING)
- DPBS (SIGMA-ALDRICH)
- PARAFORMALDEHIDO 1 %
- Azul de toluidina 0,1%
- Agua estéril

#### **PROCEDIMIENTO.**

- A. Se cosechó y colectó un concentrado de 100 $\mu$ L de suspensión celular
- B. Las células fueron sembradas en caja de 6 pozos
- C. Se les colocó 3 ml de medio DMEM
- D. Se dejó incubar durante 12 días con el fin de que las células alcanzaran un estado de confluencia mayor
- E. Pasado este tiempo, se les retiró el medio de cultivo.
- F. Se lavaron con PBS 1X 3 veces
- G. Las células fueron fijadas por medio de 1 % de Paraformaldehido en DPBS durante 30 minutos a 1 hora.
- H. Se retiró el Paraformaldehido y se añadió azul de toluidina 0,1% durante 1 hora
- I. Se lavaron las muestras con agua estéril y se dejaron secar
- J. Se realizaron las evaluaciones a 7 y 14 días
- K. Las células fueron observadas en microscopio de luz



#### 7.5 MÉTODO DE VIABILIDAD POR ALAMAR BLUE® (AB) NALGENE

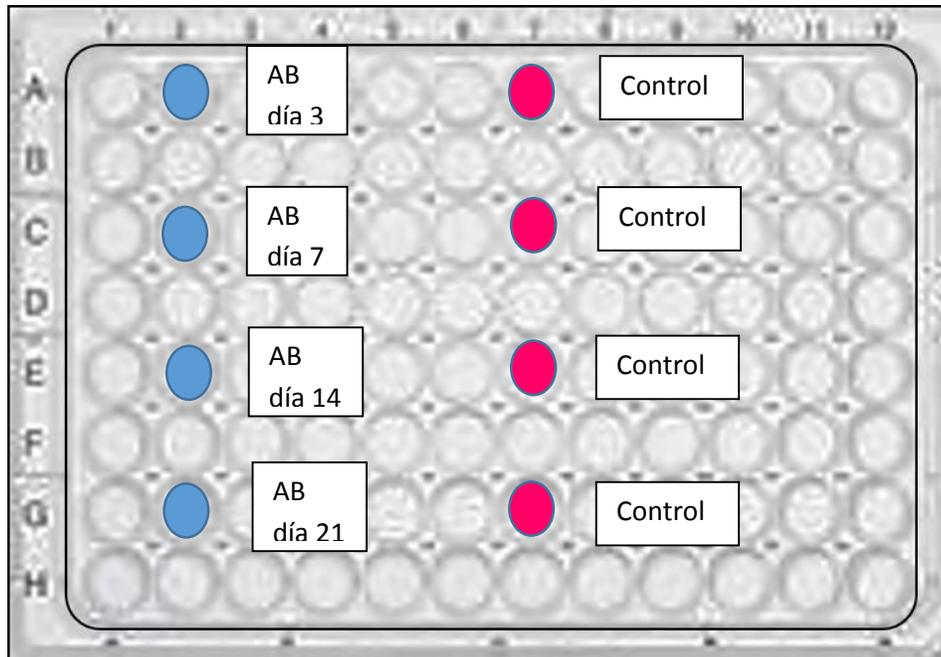
La Rezazurina es el componente activo en el Alamar Blue, y ha sido usada por décadas para medir la proliferación y la citotoxicidad en células procariotas y eucariotas (Page, Page , & Noel , 1993).

En las células metabólicamente activas, este colorante azul, no fluorescente, reduce de azul a rosa la Rezazurina y el compuesto obtenido es la Resorufina, altamente fluorescente lo que permite una medición cuantitativa de la viabilidad (O'Brien, Wilson, & Orton, 2000).

#### **PROCEDIMIENTO.**

- A. Por medio de una caja de 96 pocillos se sembraron por duplicado un aproximado de 50,000 células.
- B. Se dejó incubar para permitir su adherencia y proliferación
- C. Se preparó el reactivo colocando 299  $\mu$ l de medio DMEM sin rojo fenol y 1  $\mu$ l de AlamarBlue (INVITROGEN) dando un total de 300  $\mu$ l.
- D. Se dividió esa concentración para ser distribuida en los pocillos y colocándose medio DMEM sin rojo fenol
- E. Las evaluaciones se realizaron a 3, 7, 14 y 21 días.

- F. Cumplidos los tiempos se eliminó el medio de cultivo DMEM
- G. Se lavaron las muestras 2 veces con PBS
- H. Se realizó la lectura en lector de placas a 570 nm.
- I. En los respectivos controles, se añadió DMEM



#### 7.6 ENSAYO DE 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-Y1)-2,5 DIFENILTETRAZOL (MTT ROCHE)

Este ensayo fue descrito por primera vez por Mossman y colaboradores en 1989, el cual le da la característica de fácil, rápido y reproducible. Es un método colorimétrico rápido a base de la desnaturalización de una sal de Tetrazolium amarilla, a cristales de formazan de color púrpura por medio de enzimas mitocondriales de las células metabólicamente activas (Mossman, 1989)

Materiales:

- Reactivo MTT Roche
- Medio DMEM sin Rojo Fenol Sigma Aldrich
- Solubilizador de cristales MTT Roche

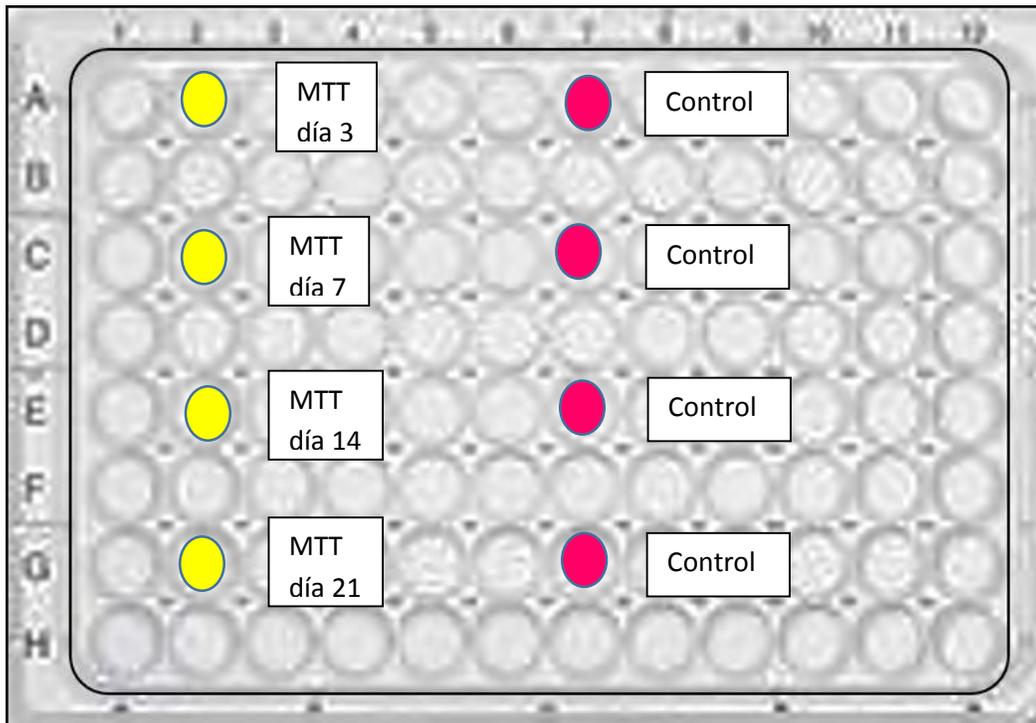


- Medio DMEM suplementado con 10%FBS y 1% Antibiótico.
- DPBS Biowest
- Micropipetas con respectivas puntas [10µl/100 µl/1000 µl
- Placas de cultivo fondo plano de 24 pocillos [estériles] Thermo
- Placas de cultivo fondo plano de 96 pocillos [estériles] Thermo
- Espectrofotómetro

## **PROCEDIMIENTO**

- A. Las células una vez cuantificadas fueron sembradas por triplicado a una densidad de 10,000 células directamente sobre el fondo de la caja de 96 pocillos
- B. Una vez sembradas las muestras, se dejaron reposar por 5 min, para su posterior colocación de medio DMEM
- C. Se colocaron en la incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C durante los días necesarios a evaluar (3, 7, 14 Y 21 días).
- D. Previo al día de la toma de lecturas, se incubó el reactivo en los pocillos a evaluar, por lo cual, se retiró el medio de cultivo, y se realizaron 2 lavados con DPBS.
- E. Ya realizados los lavados con DPBS, se preparó el reactivo MTT conjugado con medio DMEM sin rojo fenol agregando: 64 µl de medio DMEM sin ROJO FENOL con 6µl de reactivo MTT, siendo un total de 70µl de solución reactiva. La cual se dejó en incubación durante 3hrs a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> (todo este procedimiento se realizó en condiciones de poca luz, para evitar alterar el reactivo).
- F. Una vez pasado el tiempo de incubación, se agregó el solubilizante del reactivo, añadiendo 100µl a los pocillos, teniendo una concentración de 170µl. Dicha concentración se dejó en incubación por el resto de la noche, para así, realizar la lectura al día siguiente (la placa de cultivo fue cubierta con aluminio).
- G. Terminado el tiempo de incubación, se retiró el volumen total de la solución y se colocó en placas de 96 pocillos, donde, los 170µl fueron divididos en 2 para

- realizar doble lectura de las muestras, (la placa de cultivo fue cubierta con aluminio).
- H. Una vez colocadas los volúmenes correspondientes y perfectamente identificados, se insertó la caja en el lector de placas y fue leída a una densidad óptica de 540nm.
- I. Una vez leídos los datos, fueron recolectados y se realizó el análisis e interpretación por medio del programa Excel.



## 8. PRUEBAS DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN ANDAMIO. PREPARACIÓN Y SIEMBRA SOBRE ANDAMIO DE QUITOSANO POLI-L-LISINA.

### PROCEDIMIENTO

- A. Los andamios fueron cortados en trozos de 2-3 mm aproximadamente de diámetro y fueron colocados en caja de 96 pocillos



- B. Antes de colocar las células, los andamios fueron previamente acondicionados con el fin de que las células se adhieran al andamio y no al pocillo.
- C. Para los ensayos previamente mencionados tanto de viabilidad como de proliferación, se siguieron los mismos protocolos y mediciones correspondientes.

#### 9. PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA SEM (Scanning Electronic Microscope)

##### **MATERIAL:**

- Glutaraldehido al 2.5%
- PBS1X (0.1M)
- Tetróxido de osmio OsO<sub>4</sub>
- Placa de 96 pozos

##### **PROCEDIMIENTO**

Los ensayos para microscopía electrónica de barrido fueron realizados después de las primeras 48 horas del sembrado en la caja de 96 pocillos. Después las muestras fueron visualizadas a 7 y 14 días, colocándose en cada caja: andamio con células, andamio sin células y como control membrana de colágeno con células (CollaCote)

##### Pasos efectuados

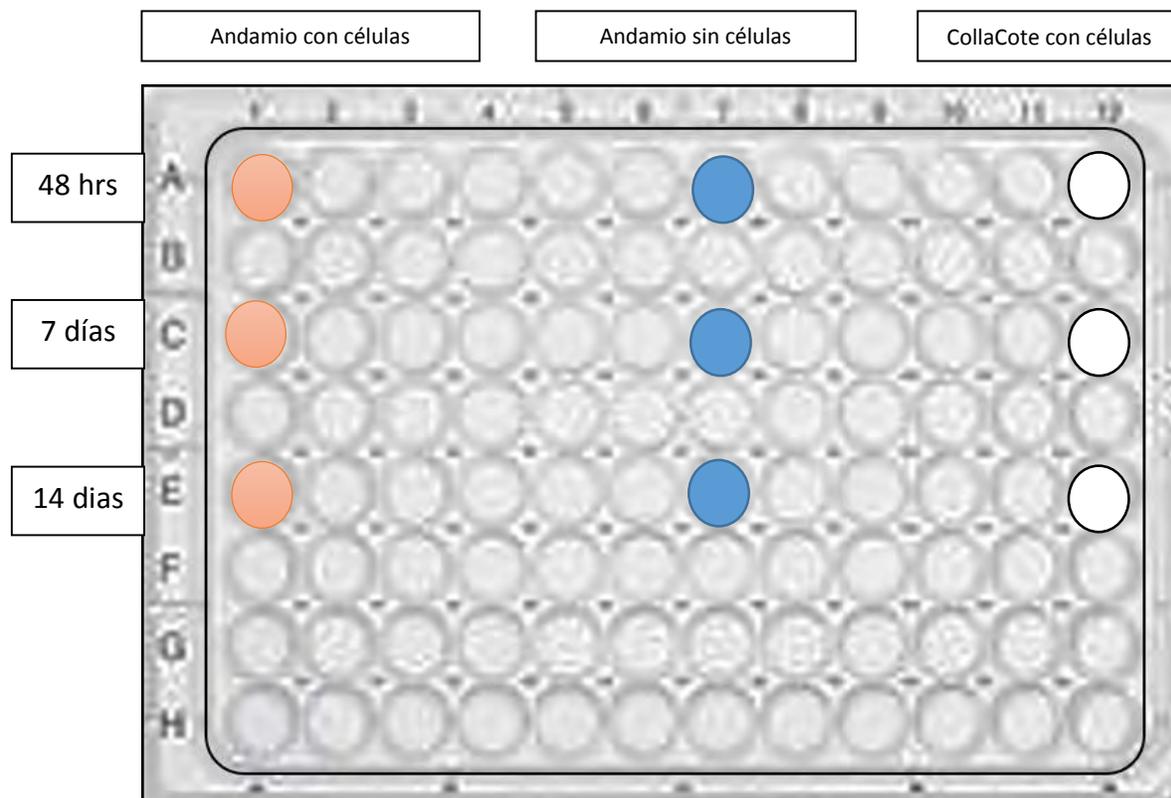
1. Fijación
2. Postfijación
3. Deshidratación

Los andamios fueron acondicionados como se describió anteriormente y las células fueron sembradas al cumplirse los tiempos a evaluar.

- A. Se retiró el medio de cultivo de las muestras
- B. Se lavó 2 veces con 200ul de PBS 1X tibio a velocidad muy lenta
- C. Se añadió Glutaraldehido al 2.5% tibio.
- D. Se dejó incubando 2 horas a temperatura ambiente.
- E. Se lavó lentamente las muestras con 200ul de PBS1X 2 veces por 5 min



- F. Se añadió Tetróxido de osmio al 1% en PBS1X, y se incubó 2 horas a temperatura ambiente.
- G. Se lavó la muestra 3 veces con PBS1X
- H. Se deshidrató con concentraciones crecientes de alcohol: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 15 minutos cada una.
- I. Finalmente la observación se realizó por medio de microscopio electrónico de barrido (SEM)





## 10. CARACTERIZACIÓN POR INMUNOMARCAJE O PRUEBA DE TRONCALIDAD

### Material

- Anticuerpo Anti-CD44 (Hermes-1) Abcam (ab119335).
- Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Alexa Fluor 488 (A-11001).
- BSA (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIES).
- PBS Tween.
- DPBS (Sigma-Aldrich).
- Paraformaldehido 4%
- tritón 100X

### **PROCEDIMIENTO**

#### A. Solución bloqueadora

Para hacer 50 ml de esta solución se realizó el siguiente procedimiento:

- BSA 1%/ 0.5 grs de albúmina sérica bovina
- 0.5 % PBS Tween/ 200 microlitros de PBS-T
- PBS 1X hasta completar.

Ejemplo:

1 ml -----Tween  
199-----PBS

- B. Se colocaron 100 microlitros de suspensión celular a una caja de 6 pocillos.
- C. Se dejó que las células proliferaran sobre la caja.
- D. Se lavó con 300 microlitros PBS 1X 3 veces y aspirar
- E. Se fijó con 300 microlitros de solución fijadora por 30 minutos
- F. Se volvió a lavar con PBS 1X 3 veces.
- G. Se permeabilizó con 300 microlitros de tritón 100X en PBS 1X por 20 minutos y aspirar.
- H. Se lavó con PBS1X 3 veces.
- I. Se bloqueó con 400 microlitros de solución bloqueadora por 1 hora a temperatura ambiente.
- J. Se lavó con PBS 1X 3 veces



K. Se colocó anticuerpo primario Anti-CD44 antibody (Hermes-1), con una dilución al 1:100, diluyéndolo en la solución bloqueadora. Se dejó toda la noche a 4°C.

Ejemplo:

1 microlitro de CD 44  
99 microlitros de solución bloqueadora.  
Total: 100 microlitros

L. Pasadas las 24 horas, se lavó con PBS 1X

M. Se colocó Anticuerpo Secundario Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor 488) con una dilución al 1: 500, diluyéndolo en la solución bloqueadora.

Ejemplo:

100 microlitros de Alexa Fluor 488  
100 microlitros de solución bloqueadora  
Total: 200 microlitros

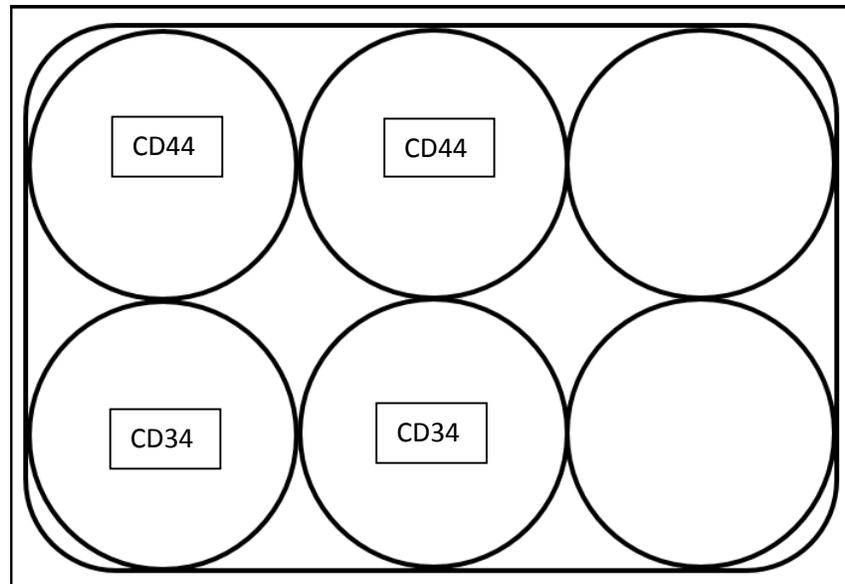
N. Se dejó a temperatura ambiente por 2 horas o toda la noche a 4°C.

O. Se realizó a oscuras y tapándolo con papel aluminio

P. Se Lavó con PBS 1X

Q. Se lavó con 300 microlitros de agua destilada para quitar restos de cristales.

R. Finalmente se procedió a la observación al microscopio de fluorescencia.



## 11. CIRUGÍA PARA CREACIÓN DE DEFECTO ÓSEO EN RADIO DE CONEJOS NUEVA ZELANDA

### Material

- Hojas de bisturí
- Regla de plástico milimetrada
- Fresas quirúrgicas 702
- Mango para bisturí
- Colla cote (ZIMMER)
- Motor con pieza de mano
- Sutura
- Gasas estériles
- Benzal

### **PROCEDIMIENTO**

Previo al acto quirúrgico, las células madre mesenquimales fueron colocadas en el andamio dos días previos a su implante en el conejo, para permitir la proliferación sobre el biomaterial.



- A. Se realizaron las cirugías de la creación de los defectos óseos en el radio de los conejos de aproximadamente de 10 mm de longitud por medio de fresas quirúrgicas (702) para baja velocidad.
- B. Los conejos fueron sometidos a anestesia por medio de una inyección intramuscular de Ketamina y Xilazina, y con las características que se habían descrito anteriormente con respecto al manejo del conejo y su preparación para el acto quirúrgico.
- C. Se realizaron las consideraciones pertinentes que indicaron que los conejo estuvieran sedado, mediante los puntos y reparos anatómicos palpables como lo son:
  - Alrededor de los ojos (reflejo palpebral).
  - Por dentro del oído (reflejo auricular).
  - Apretando el pie (reflejo pedal), siendo este el más efectivo.
- D. Se colocó al conejo en posición lateral ubicando el radio en la parte más medial del miembro superior
- E. Se rasuró todo el miembro superior,
- F. Se le colocó Benzal en toda la superficie que a tratar,
- G. Una vez que la piel del conejo este completamente desnuda y bien rasurada, se procedió con la incisión en la piel por medio de una hoja de bisturí #15 con mango #3.
- H. Se realizó una incisión de aproximadamente 10 mm sobre el eje longitudinal del miembro del animal.
- I. Se incidió la piel, después músculo teniendo en cuenta de no lesionar ligamentos, tendones y vasos ya que estos son de importancia para que el animal desempeñe sus movimientos y dinámicas de manera normal.
- J. Una vez ubicado el radio por medio de una fresa de fisura y con pieza de mano de baja velocidad, se procedió a realizar el defecto óseo con dos marcas efectuadas con la fresa, y midiéndolas con regla corta flexible y así cumplir con los 10 mm que estipula el protocolo.
- K. Se mantuvieron los signos vitales del conejo y las pupilas humectadas e hidratadas.



### 11.1 IMPLANTACIÓN DEL ANDAMIO.

- A. Se presentó el andamio con el defecto con el fin de que estos cumplan los requisitos dimensionales.
- B. El andamio fue recubierto por medio de una membrana de colágeno (colla-cote ZIMMER), inmediatamente implantado en área del defecto.
- C. Una vez colocada, se procedió a colocar puntos de sutura de una sola intención con el fin de no estresar al conejo.
- D. Durante una semana se mantuvieron a los conejo bajo tratamiento antibiótico (Benzetacil 1, 200,000 U) y analgésico (Ácido Acetil salicílico), con en el fin de evitar infecciones postoperatorias.

### 11.2 ESTUDIO RADIOGRÁFICO.

#### Material

- Aparato de rayos x
- Películas radiográficas oclusales

Se dio seguimiento a la neo formación ósea por medio de análisis radiográfico a diferentes tiempos

- A. Radiografía preoperatoria
- B. Radiografía transoperatoria
- C. Radiografía 1 mes

### 12. EUTANASIA

#### MATERIAL

- Cámara de CO<sub>2</sub>
  - CO<sub>2</sub>
  - Solución fijadora
- A. Los conejos hembras de raza Nueva Zelanda fueron sacrificados al mes de haber llevado acabo el acto quirúrgico, los cuales fueron saturados por medio de gas (CO<sub>2</sub>)



- B. Se esperó de 5 a 10 minutos y verificó que cesaran las funciones vitales de los conejos.
- C. Las muestras fueron recolectadas o removidas quirúrgicamente desde el codo hasta la muñeca.
- D. Inmediatamente fueron sumergidas en solución fijadora (Paraformaldehido con ácido Pícrico) con el fin de preservar en perfectas condiciones las proteínas.

### 13. TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

Después de transcurrido el tiempo de estudio, la muestra fue analizada por medio de tomografía computarizada (Cone Beam) para corroborar la neo formación ósea y densidad ósea.

### 14. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

#### Material

- Solución fijadora
- Ácido nítrico al 5%
- Alcohol absoluto 100
- Alcohol al 96
- Alcohol al 70
- Aceite de cedros
- Alcohol absoluto/Amílico
- Alcohol Amílico Puro.
- Paraplast
- Parafina
- Estufa para parafina
- Conformador de cubos
- Hojas de bisturí
- Portaobjetos
- Microtomo
- Plancha de extensión
- Xylol



- Hematoxilina de Harris
- Agua destilada
- Amoniaco
- Eosina
- Microscopio óptico
- Entelan

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. Fijación
2. Descalcificación
3. Deshidratación (tren de alcoholes)
4. Inclusión en parafina
5. Corte y montaje

## **PROCEDIMIENTO**

### FIJACIÓN

- A. La muestra de tejido óseo fue colocada en tubo de punta cónica con solución fijadora (Paraformaldehído al 2% con Ácido Pícrico)
- Se le añadió el Ácido Pícrico con el fin de preservar por más tiempo las proteínas y no desnaturalizar.
- B. Las muestras se dejaron 3 días en contenido fijador.
- C. Pasado los tiempos, las muestras óseas fueron descalcificadas por medio de Ácido Nítrico al 5%
- Las concentraciones bajas del Ácido Nítrico provocaron que este actué como un quelante con el fin de que el material óseo, iones cálcicos, no se degraden rápidamente.
- D. Se dejaron en el Ácido Nítrico por 5 días con el fin de que la muestra se descalcificara completamente.

### DESHIDRATACIÓN (TREN DE ALCOHOLES)



- A. Pasados los tiempos de descalcificación, las muestras fueron deshidratadas por medio del tren de descalcificación o tren de alcoholes
- Este tren de alcoholes corresponde de la siguiente manera el orden en el que son colocados
1. Alcohol al 70%
  2. Alcohol al 96% #1
  3. Alcohol al 96% #2
  4. Alcohol absoluto #1
  5. Alcohol absoluto #2
  6. Aceite de cedros.
- B. Se dejó la muestra en alcohol al 70 % por 24 horas
- En el alcohol al 70% Se puede quedar hasta por 48 horas.
- C. Pasadas las 24 horas las muestras de tejido óseo fue lavado con PBS 1X y trasladadas al alcohol al 96% #1
- Es importante que una vez colocadas las muestras en alcohol 96 % ya no se puede interrumpir el tren de alcoholes.
- D. Las muestras en alcohol al 96% #1 fueron deshidratadas por 1 hora.
- E. Pasados los tiempos, las muestras fueron lavadas con PBS 1X y trasladadas a alcohol al 96% #2 de igualmente por 1 hora
- F. Finalmente las muestras fueron lavadas y trasladadas a Aceite de Cedros
- Se dejaron en aceite de cedros de 3 a 5 días hasta observar que las muestras se transparenten.

## INCLUSIÓN EN PARAFINA

- La inclusión en parafina se realizó de la siguiente manera:
- A. Se eliminó el aceite de cedros y se sumergieron en aceite de cedros con cloroformo concentración 1:1 por 30 minutos
  - B. Concluido el tiempo se colocó parafina de transición con punto de fusión de 54°C
  - C. Se dejó en estufa L-C OVEN por 30 minutos.



- D. Después de este tiempo se retiró la parafina de transición y Se coloca parafina #1.
- E. Se dejó en estufa por 2 horas
- F. Transcurrido el tiempo se retiró parafina # 1 y se colocó parafina #2, Se dejó en estufa por 2 horas
- G. En seguida se retiró la parafina #2 y se colocó parafina #3 (Paraplast).
- H. Se dejó por 1 hora.
- I. Pasado este tiempo fue vertido el contenido en moldes para conformar los cubos de parafina
- Dichos cubos deberán estar previamente seleccionados y etiquetados para identificar las muestras.
- J. Las muestras fueron cortadas exactamente en la parte central del andamio con el fin de tener un par de la misma zona de interés
- Las porciones seccionadas fueron orientadas de tal forma para poder realizar directamente los cortes sobre el andamio
  - El tejido fue colocado para que la porción de interés este directamente con el microtomo.
- K. Se orientaron las muestras hacia la zona de interés y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 24hrs a 4°C
- L. Posteriormente se procedió a realizar los cortes en microtomo.

#### CORTE DE LAS MUESTRAS

- A. Con el fin de facilitar los cortes se le colocó "Ruitter"
- B. Los cortes fueron realizados por medio de hojas para microtomo con un grosor de 5 micras.
- C. Una vez realizados los cortes se tomaron con extremo cuidado con el fin de no dañar la muestra.
- D. Se colocaron en portaobjetos
- E. Se colocaron en una plancha de extensión a 50° C con el fin de la que la muestra se expanda.



- F. Las muestras en cubreobjetos se llevaron al horno con el fin de derretir la parafina restante.
- G. Las muestras se llevaron a Xylol para eliminar la parafina.

#### 14.1 TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)

Para realizar esta tinción fue necesario hidratar las muestras por medio de tren de hidratación.

- A. Las muestras fueron sumergidas en Xylol #1 por 10 minutos
- B. Después se retiró el Xylol #1 y fueron sumergidas en Xylol #2 durante 10 minutos
- C. Posteriormente se retiró el Xylol #2 y fueron pasadas a alcohol absoluto #1 por 5 minutos. Concluido el tiempo, las muestras fueron hidratadas en tren de alcoholes.
  - a. Alcohol absoluto #2 por 5 minutos.
  - b. Alcohol 96% #1 por 5 minutos.
  - c. Alcohol 96% #2 por 5 minutos.
  - d. Alcohol 70% por 5 minutos.
- D. Se lavaron en agua corriente por 7 minutos.
- E. Las muestras fueron colocadas en Hematoxilina de 3 a 5 minutos.
- F. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron lavadas 3 veces en agua corriente hasta observar que el colorante se vaya perdiendo.
- G. Fueron sumergirlas en alcohol acido rápidamente.
- H. Inmediatamente fueron lavadas con agua
- I. Luego sumergidas en agua amoniacal y lavadas rápidamente con agua corriente.
- J. Las muestras fueron sumergidas en Eosina por 5 minutos.
- K. Pasados el tiempo, se colocaron en el tren de deshidratación ya antes mencionado (5 minutos por alcohol).
- L. Se terminó colocado Xylol por 20 minutos
- M. Los Portaobjetos fueron retirados y se les colocó una gota de “Entelan” y colocándoles cubreobjetos.



N. Por ultimo las muestras fueron revisadas en microscopio óptico.

O. Se llevaron a microscopio óptico para observar lo siguientes aspectos celulares:

Hematoxilina (azul). Regiones ácidas del citoplasma.

Eosina (rosa). Regiones básicas del citoplasma y fibras colágeno.



## 10. RESULTADOS

### 10.1 TÉCNICA DE ASPIRADO MEDULAR

Antes de realizar las intervenciones quirúrgicas, se efectuó la valoración clínica de los conejos los cuales gozaban de buena salud. El acto quirúrgico no presentó problema alguno, ya que la dosis de anestesia fue la correcta, como se observa en la tabla 1.

Conejo	Peso	Dosis anestésica	Miembro intervenido	MI de médula ósea
1	2600 kg	1.3 ml	miembro inferior derecho	5ml
2	2400 kg	1.2 ml	miembro inferior izquierdo	5ml

**Tabla 1. Representación de los datos de la población de conejos.**

Además, no existieron problemas o complicaciones postoperatorias. Se realizaron revisiones periódicas para valorar el progreso postquirúrgico. La técnica de obtención de médula ósea se llevó a cabo en ambiente de esterilidad tanto de instrumental, equipo como personal capacitado. El procedimiento de obtención de médula ósea por medio de aguja tipo Ossgood insertada en la epífisis distal femoral fue eficiente, efectiva y aplicada en los 2 conejos ya que se logró obtener 5 ml de médula por conejo sin presencia de patógenos o contaminación como se muestra en la figura 2. No se presentaron problemas de carácter infeccioso ya que la dosis administrada de antibiótico (benzetacil 1, 200,000u) fue la correcta como se muestra en la figura 1.



Figura 1.

A la observación clínica postoperatoria, los conejos consiguieron la función normal de su extremidad intervenida o cese de la claudicación, después de las primeras 3 horas.



Figura 2.

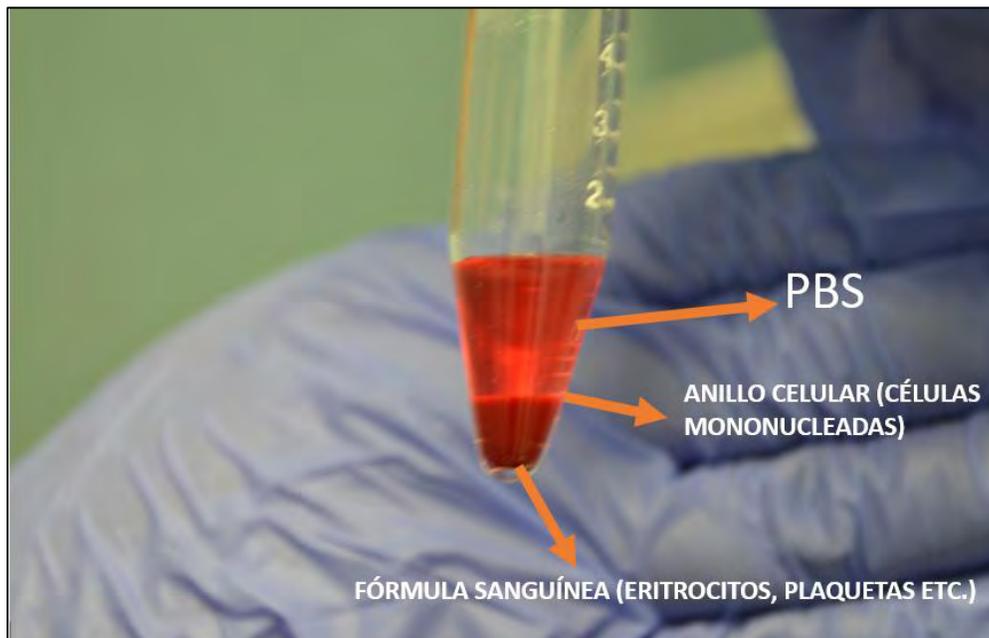
La médula fue recolectada en los tubos Vacutainer de tapa lila, su contenido de EDTA favoreció la preservación y el traslado de la médula y de todos sus componentes al laboratorio académico de ingeniería Tisular y Medicina Traslacional. Durante ese traslado no se presentó algún problema de coagulación de la muestra, debido a que se mantuvo en los tubos de transporte y en constante movimiento como se muestra en la figura 3.



**Figura 3.**

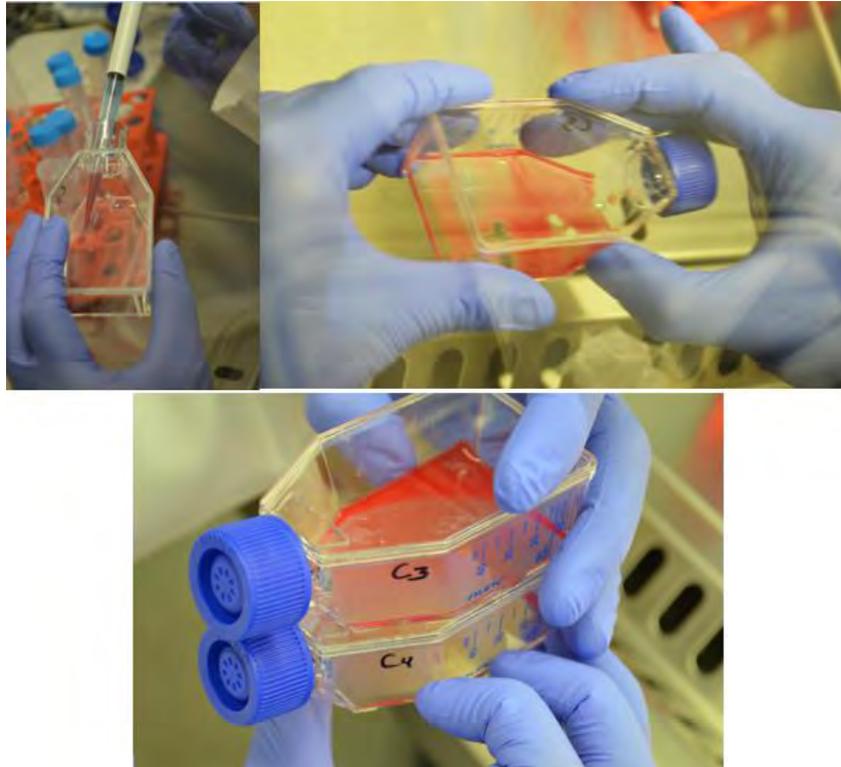
### 10.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA

La técnica de aislamiento por medio de centrifugación por gradientes de densidad y sin ningún tratamiento permitió la separación o aislamiento de células mononucleadas por medio de la formación de capas visibles y un anillo celular en la porción intermedia o también conocida como interfase, el cual fue recolectado, y posteriormente aislados de los demás componentes y elementos sanguíneos. La técnica de aislamiento primeramente permitió recuperar el anillo celular compuesto por células mononucleadas y su posterior cultivo como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Separación por medio de la técnica de centrifugación de gradientes donde se aprecia la interfase o anillo celular localizado en medio del PBS y fórmula sanguínea.

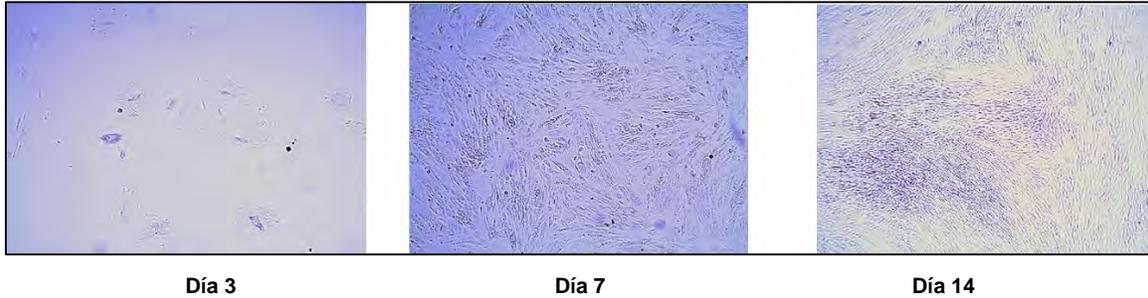
El cultivo celular fue realizado de acuerdo al protocolo y después de esto, las células fueron observadas diariamente bajo microscopía óptica invertida y cámara fotográfica digital con el fin de dar seguimiento, evaluación a la morfología y estado de confluencia como se muestra en la figura 5.



**Figura 5. Cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea.**

Las células madre mesenquimal es aisladas de médula ósea mostraron un crecimiento óptimo en un cultivo primario bajo las condiciones descritas previamente. La técnica de cultivo empleada permitió que en un plazo de 14 días, las células llegaran a un estado confluyente del 60 al 80% con formaciones de colonias al séptimo día. Como características principales, las células presentaron adherencia al plástico, morfología fibroblastoide y alargada, con prolongaciones y núcleos excéntricos. Se realizaron las evaluaciones a 3, 7 y 14, donde al tercer día se comienzan a observar grupos de células aisladas sobre la superficie del plástico de la caja de cultivo, para el día 7 se observó una monocapa de células adherentes y para el día 14 Se logró llegar un estado de confluencia celular de 60%. Los pasajes

celulares permitieron expandir los cultivos celulares hasta un tercer pasaje celular el cual posteriormente fue purificado para obtener poblaciones homogéneas como se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Imágenes obtenidas por medio de microscopia óptica de campo claro y fotografía digital, donde se puede observar el crecimiento poblacional de células madre mesénquimas heterogéneas. Aumento 4x**

### 10.3 PURIFICACIÓN DE CULTIVOS CELULARES.

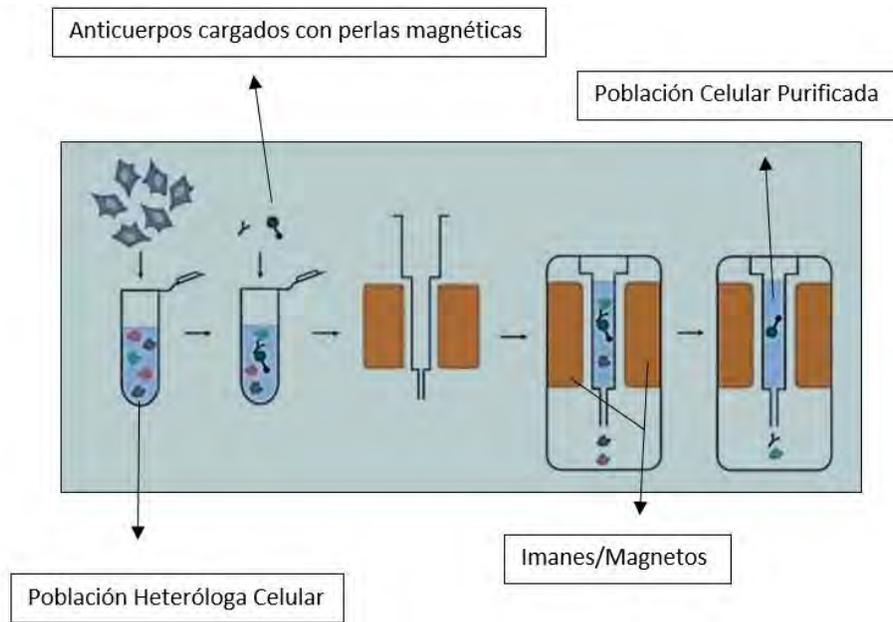
Este estudio logró el aislamiento de células madre mesenquimal es por medio de inmunomagnetismo (MACS) con el anticuerpo CD44.



**Figura 7**

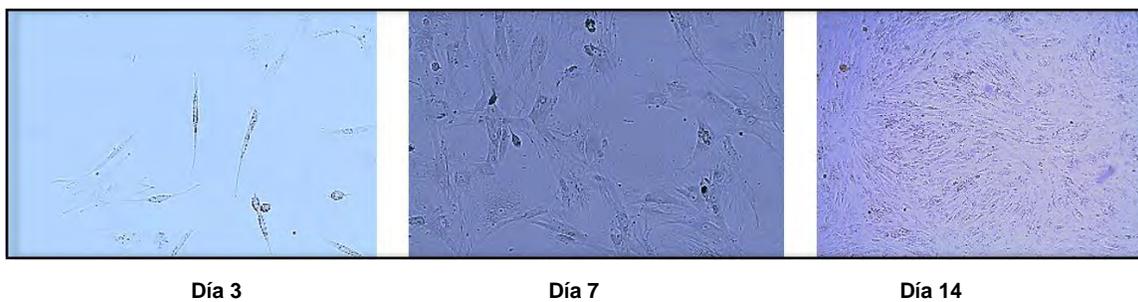
La técnica de purificación por medio de Inmunomagnetismo (MACS) indicó que el marcador CD44, es un marcador positivo para células mesenquimal es, ya que estas fueron Separadas del resto. Los magnetos o imanes lograron retener las células marcadas con los anticuerpos por medio de las perlas magnéticas que contienen como se muestra en la figura 7.

Las células positivas a este anticuerpo fueron Separadas del resto, reteniéndose en los imanes de la columna quedando únicamente células homólogas como se muestra en la figura 8.



**Figura 8.**

De igual manera Se realizaron las evaluaciones a 3, 7 y 14 días con células ya purificadas, las cuales presentaron confluencia celular del 60 al 80 % para el día 14. Las células mostraron las características descritas anteriormente (Figura 4).



**Figura 9.** Imágenes obtenidas por medio de microscopía óptica de campo claro donde Se puede observar el crecimiento poblacional de células madre mesénquimas purificadas. Aumento 4x.

#### 10.4 PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular fue analizado mediante microscopía de fluorescencia por medio del ensayo LIVE/DEAD, la cual fue evaluada a 3, 7 y 14 días. La prueba determino la viabilidad celular por el grado de fluorescencia que emitían las células por medio de 2 colores (verdes=células vivas, rojo=células muertas) como se muestra en la figura 10.

La Calceína AM tiñó de color verde las membranas celulares viables por medio de la actividad Esterasa Intracelular.

El Homodímero de Etidio tiñó los núcleos celulares rojos de aquellas células que presentaban algún daño en la membrana ya que la prueba mide la integridad de la membrana celular.

Se puede apreciar las poblaciones celulares viables las cuales fueron Sembradas en caja de 6 pozos para la realización del ensayo, en dichos pozos Se realizó un conteo de manera arbitraria o de tal manera que esos datos expresados en la fluorescencia fuesen cuantificables, ya que la técnica LIVE/DEAD es una técnica visual. Los datos anteriormente mencionados se expresaron en la gráfica 1.

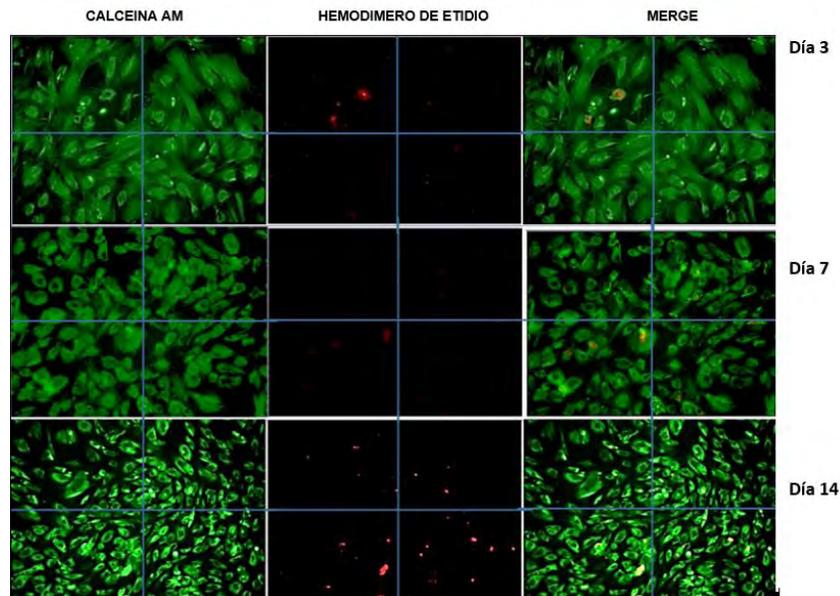
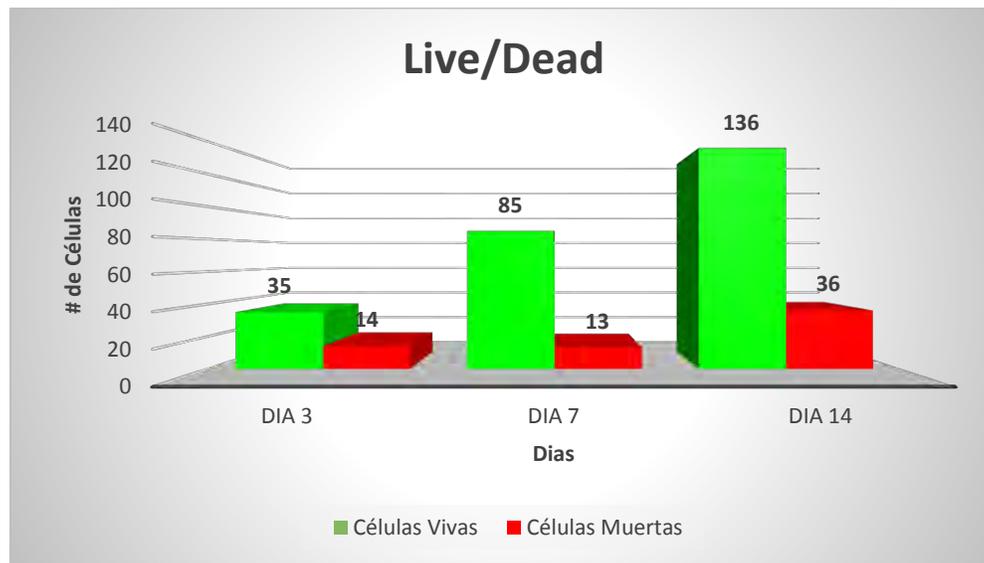


Figura 10. Ensayo de viabilidad celular Live/Dead donde se aprecian células vivas (verde), células muertas (rojo)

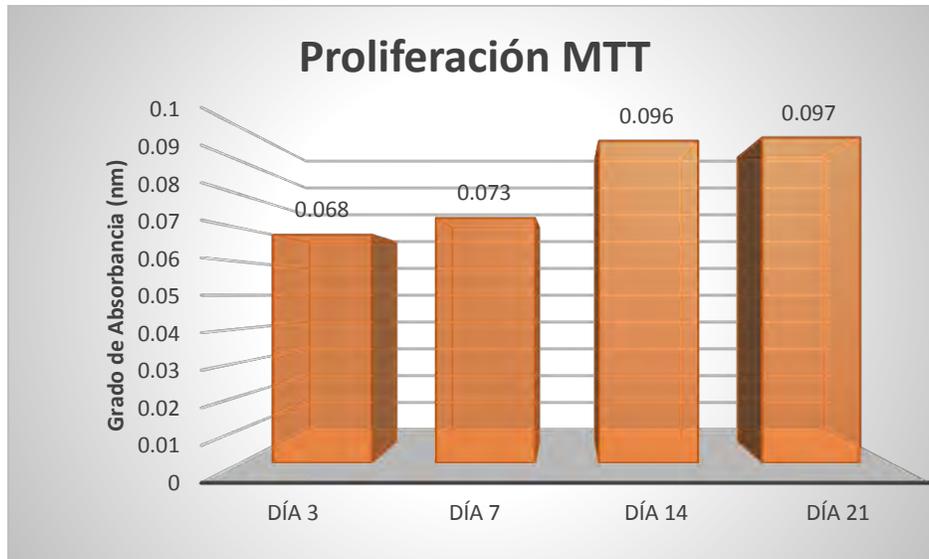


Grafica 1. Grafica de barras donde se muestra en número de células viables y muertas por medio de la prueba de viabilidad Live/Dead.

### 10.5 ENSAYO MTT

La sal de tetrazolium fue disuelta a cristales de formazan de color púrpura por medio de la actividad mitocondrial y así medir la tasa de proliferación por las células metabólicamente activas. La prueba Se realizó por duplicado, las absorbancias fueron leídas en lector de placas. La tasa de proliferación Se expresó por medio de una curva de crecimiento.

La curva de crecimiento mostró la tasa de proliferación que hubo entre los diferentes días, de los cuales del día 3 al día 7 la proliferación celular no tuvo un incremento tan representativo a diferencia del día 7 al 14 donde se muestra el mayor crecimiento proliferativo como se aprecia en la gráfica 2.



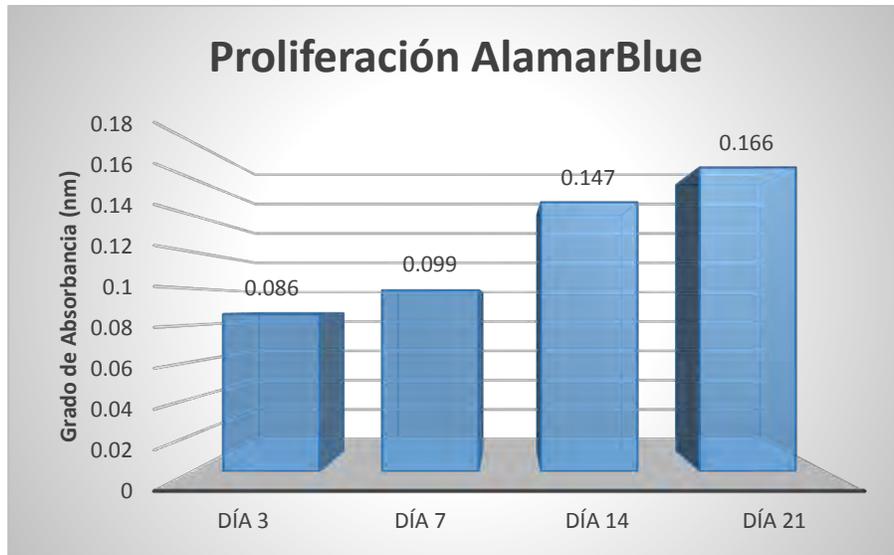
Gráfica 2. Grafica de barras donde Se muestra la proliferación celular por medio de la reducción del MTT

#### 10.6 ENSAYO ALAMARBLUE

Al igual que el MTT la actividad metabólica celular fue medida por medio de la reducción del AlamarBlue a los 3, 7, 14 y 21 días de igual forma las células previamente fueron Sembradas en cajas de 96 pozos. El nivel de absorbancia fue medido por medio de espectrofotometría usando un lector de placas estándar a 570 nm. Los datos fueron procesados en tabla de Excel.

La curva de crecimiento indicó que el número de células metabólicamente activas esta correlacionado con la magnitud de reducción del tinte y se expresa como el porcentaje de tasa de reducción de AlamarBlue.

La grafica demuestra la actividad proliferativa celular de la cual del día 7 al 14 fue significativamente mayor a diferencia de los demás y que en el día 21 alcanzó mayor grado de absorbancia y en consecuencia la mayor tasa de proliferación como se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 3. Grafica que muestra la proliferación celular por medio de la reducción del MTT

#### 10.7 ENSAYO CFU (Colony-Forming Units)

La eficiencia de la formación de colonias fue evaluada por medio de la técnica de tinción Azul de Toluidina, donde las colonias fueron teñidas con colorante azul. En esta prueba el azul de toluidina posee una afinidad por los ácidos nucleicos, por lo tanto se une a los componentes nucleares de los tejidos con un alto contenido de DNA y RNA y así teñir a aquellas células que se encuentren en fase proliferativa (figura 11).



Figura 11. Prueba CFU por medio de la tinción Azul de Toluidina

Este ensayo fue contabilizado por colonias, cada colonia compuesta por 50 células, Sembradas previamente en caja de 6 pocillos. Las evaluaciones se realizaron a 2 tiempos los cuales fueron 7 y 14 días (figura 12).

Se puede apreciar las formaciones de colonias y la discrepancia que hay entre 7 y 14 días, del día 7 al 14 fueron contabilizadas 12 colonias a diferencia del día 14 en el cual se observaron 53 colonias con una discrepancia de 41 colonias, demostrando que el crecimiento fue significativo como se observa en la gráfica 4.

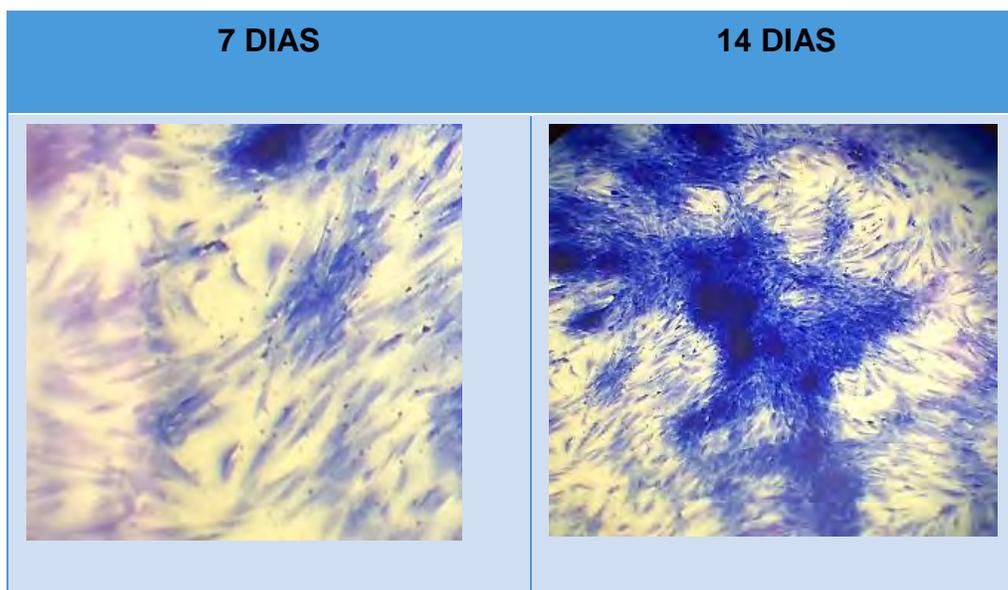
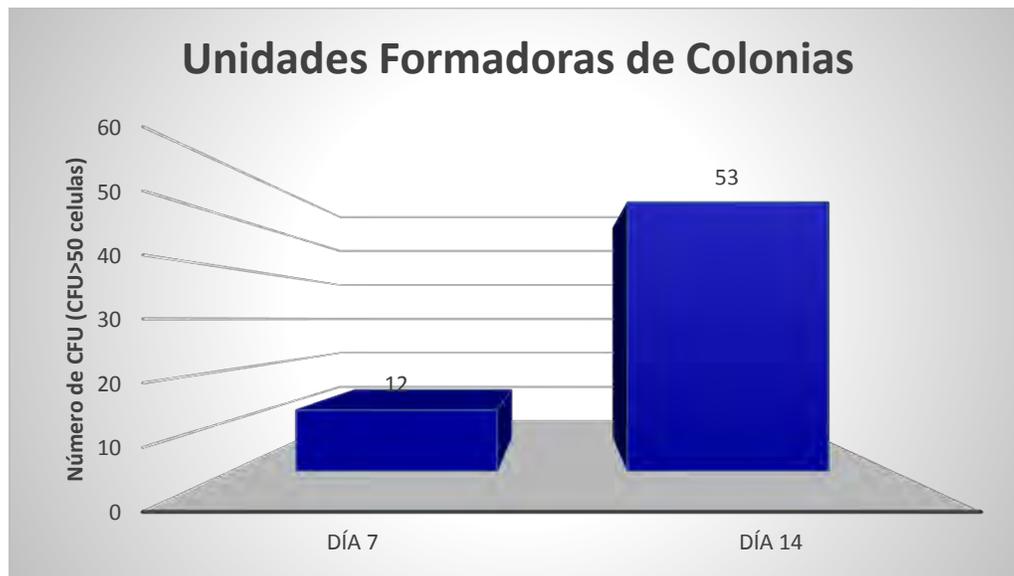


Figura 12. Ensayo CFU realizado a los tiempos correspondientes



Gráfica 4. Grafica que muestra la eficacia de las unidades formadoras de colonias teñidas con azul de toluidina

### 10.8 INMUNOFENOTIPIFICACIÓN

La identificación o caracterización del fenotipo de las células madre mesenquimal es provenientes de médula ósea de conejo fue por medio de anticuerpos. En este caso con antiCD44 para células mesenquimal es y antiCD34 como marcaje negativo ensayo realizado en el tercer pasaje celular

Las células fueron incubadas con marcador de membrana CD44, el fluorocromo empleado fue Alexa Fluor 488 el cual tiñó las membranas celulares de color verde intenso y finalmente una tinción nuclear para evidenciar la presencia de núcleos celulares el cual se realizó por medio del ensayo DAPI. La observación se realizó por medio de microscopio de fluorescencia como se observa en la figura 13.

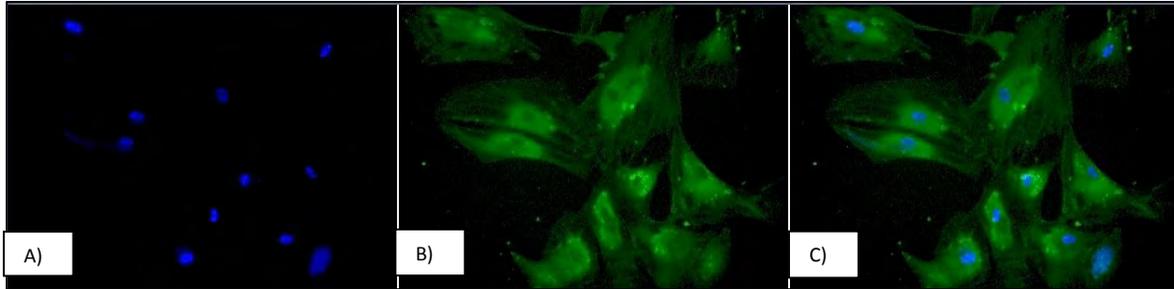


Figura 13. Inmunofenotipificación A) Inmunofluorescencia por medio de DAPI para evidenciar la presencia de células mesénquimas con marcaje negativo a CD34. B) Inmunofluorescencia por medio de CD44 y Alexa Fluor 488 como fluorocromo. C) Merge. 10X

A la caracterización las células mostraron morfología en forma de huso, alargada y apariencia fibroblastoide. Basados en microscopía de fluorescencia, análisis inmunofluorescente, las células mesenquimales de conejo mostraron positividad por el marcador de membrana CD44 similares a las humanas y negativas a CD34. La membrana celular emitió fluorescencia de color verde, el control se realizó por medio del anticuerpo CD34 el cual es un marcador específico para células madre de linaje hematopoyético y por consecuente las células no emitieron fluorescencia (figura 14).

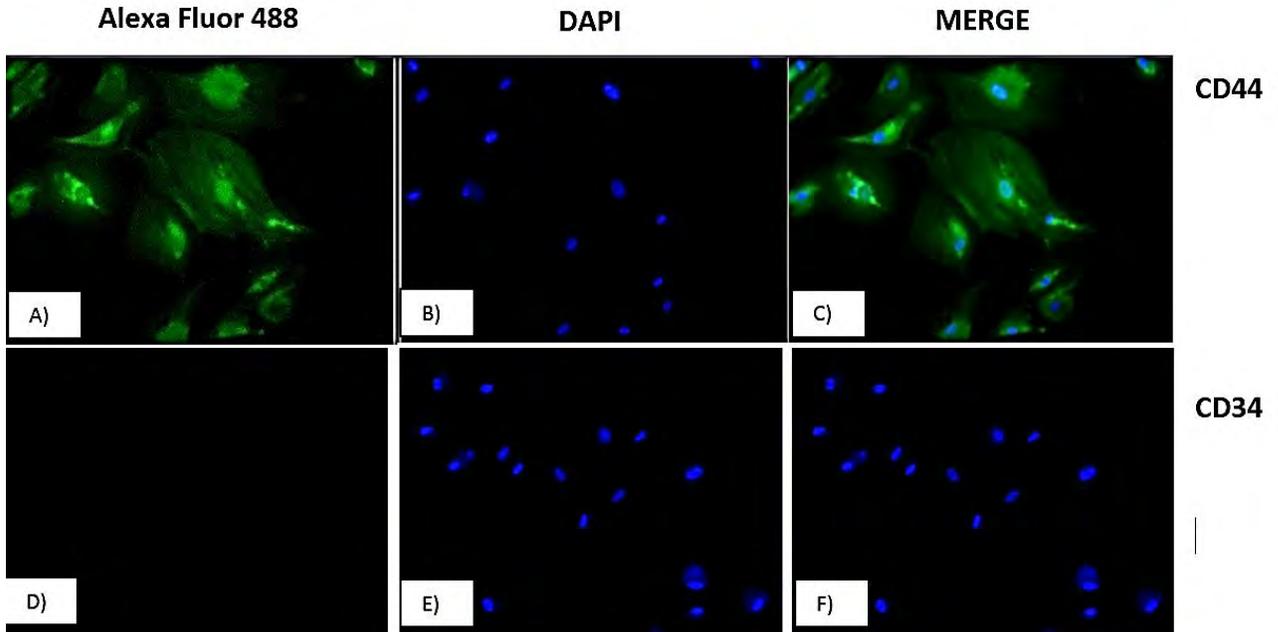


Figura 13. Inmunofenotipificación A) Células madre mesenquimal es inmunoidentificadas por medio del marcador específico de membrana CD44 y Fluorocromo Alexa Fluor 488 emitiendo fluorescencia de color verde. B) Células madre mesenquimal es inmunoidentificadas por medio del marcador nuclear DAPI emitiendo fluorescencia de color azul. C) Merge. D) Células madre mesenquimal es inmunoidentificadas por medio del marcador específico de membrana CD34 y Fluorocromo Alexa Fluor 488 sin presencia de fluorescencia. E) Células madre mesenquimal es inmunoidentificadas por medio del marcador nuclear DAPI emitiendo fluorescencia de color azul. F) Merge. 10x.

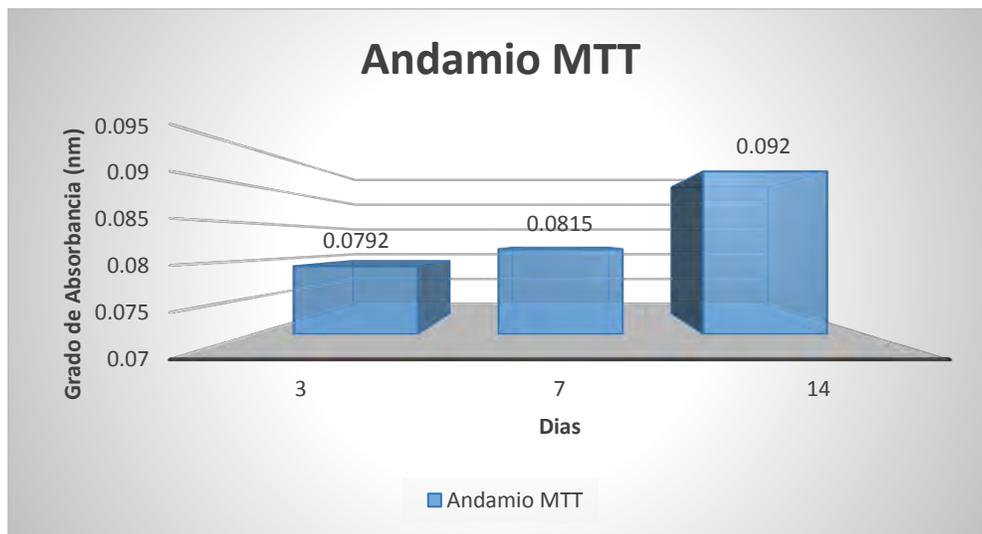
### 10.9 PRUEBAS VIABILIDAD, PROLIFERACION Y ADHESIÓN CELULAR EN ANDAMIOS

Las pruebas de proliferación celular en andamios demostraron la actividad metabólica ejercida por las células en el biomaterial, y el grado de toxicidad que ejerce el material sobre las células.

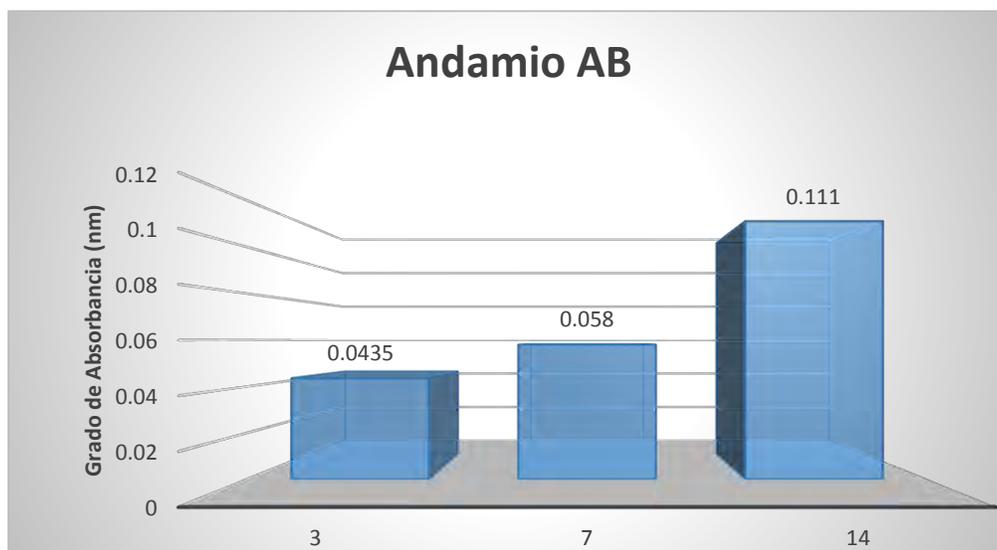
Los ensayo MTT y AB para proliferación celular, demostraron la tasa de proliferación que ejercen las células sobre el andamio, no obstante en la prueba de MTT en comparación con la prueba AB, la tasa de proliferación del día 14 al 21 disminuyo de un 0.092 a 0.064 lo que puede indicar una pérdida en la adhesión celular y por ende muerte celular, en la prueba AB esa perdida en la adhesión celular no fue detectada, aunque la tasa de proliferación fue mayor en la prueba mencionada como se muestra en la gráfica 5 y 6.



El análisis fluorescente determinado por la prueba LIVE/DEAD demostró que las células son perfectamente capaces de sobrevivir sobre el andamio a base de Quitosano ya que las células que fluorecieron de color rojo (indica daño a nivel membrana) fueron mínimas a diferencia de las que fluorecieron de color verde (indicativo de viabilidad celular) como se muestra en la figura 15.



Gráfica 5. Pruebas de proliferación celular en andamio (MTT).



Gráfica 6. Pruebas de proliferación celular en andamio (AB).

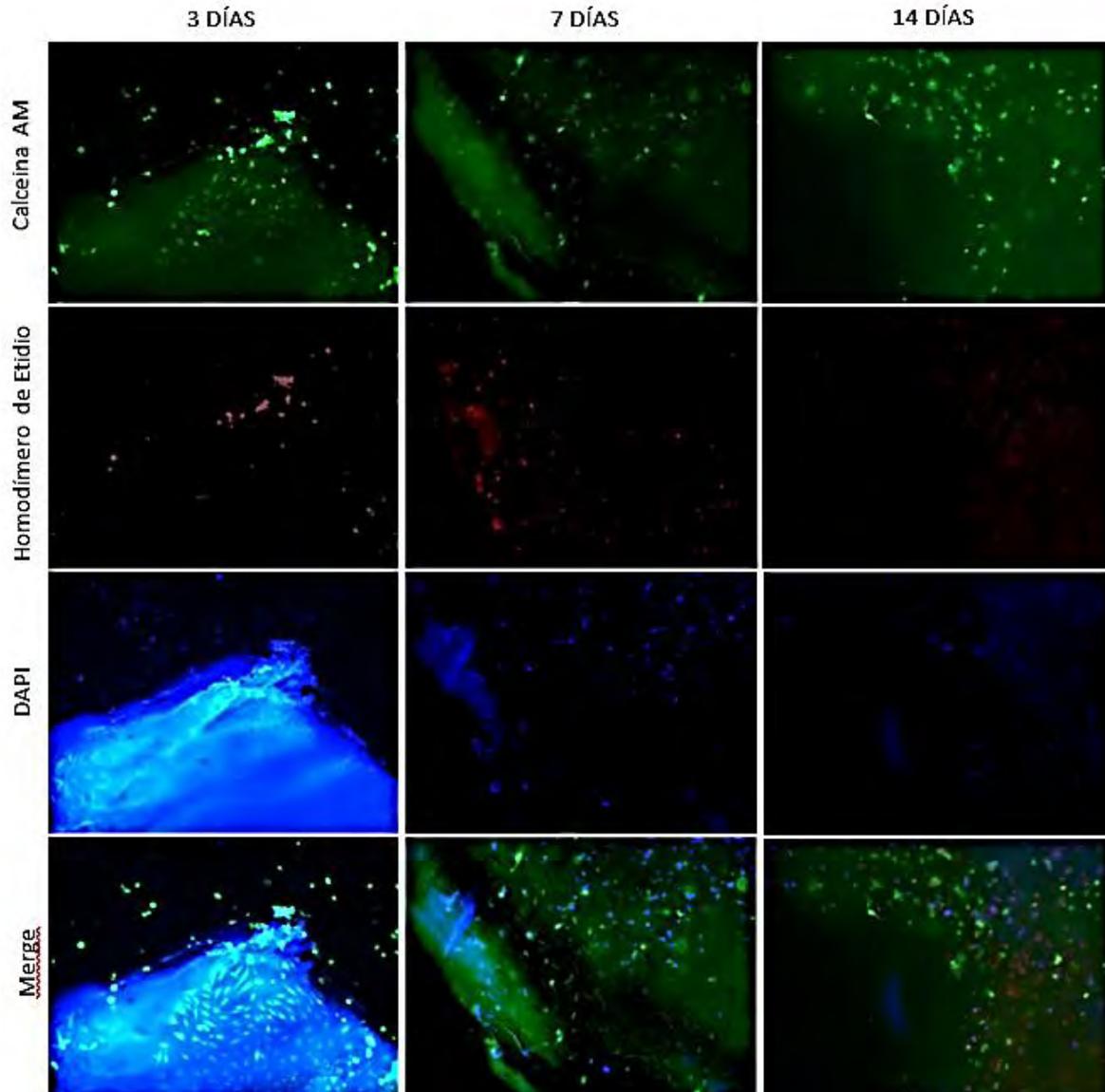


Figura 15. Pruebas de viabilidad por medio de Kit LIVE/DEAD

La adhesión y morfología celular en el andamio fue visualizada por medio de Microscopia Electrónica de Barrido donde se puede apreciar la arquitectura del andamio y la disposición que tienen las células sobre este (figura 16). La distribución de los poros en los cuales las células se encuentran alojadas sobre todas las superficies del andamio fue evaluada.

Se puede observar la morfología celular (ahusada o de apariencia fibroblastoide y núcleos alargados) que adquieren las células adheridas al andamio lo que demuestra que las células son viables en contacto con el andamio (figura 17).

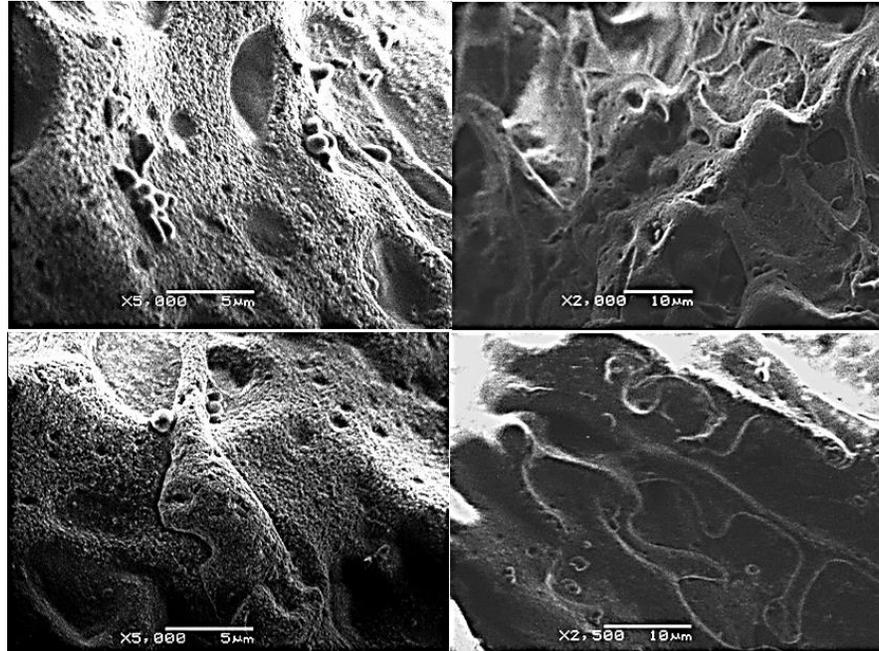


Figura 16. Estructura de andamio de Quitosano con poli-L-Lisina cumplidos los 15 días por medio de Microscopia electrónica de Barrido

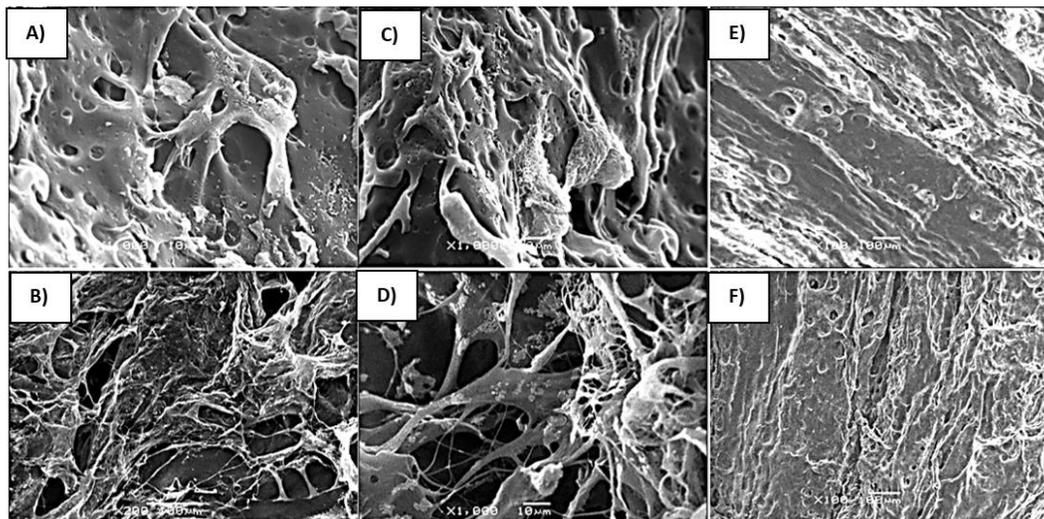


Figura 17. Microscopia Electronica de Barrido A) Anadmio de Quitosano con lisina con células mesenquimales Sembradas a las primeras 48 horas B) Membrana de colageno (CollaCote) con células mesenquimales sembradas a las primeras 48 horas C) Andamio de Quitosano/Lisina con células mesenquimales evaluado a los 7 días D) Membrana de colageno (CollaCote) con células mesenquimales sembradas a Membrana de colageno (CollaCote) con células mesenquimal es evaluada a los 7 días. E,F) Anadmio de Quitosano/Lisina sin células.

### 10.10 ACTO QUIRÚRGICO

La incisión realiza permitió la perfecta visibilidad del campo operatorio, así como la visualización de los tejidos adyacentes, circundantes, la exposición del hueso a intervenir y su respectiva medición. La fresa quirúrgica 702 facilito y agilizo el corte del tejido óseo. El andamio previamente acondicionado tanto en tamaño como dimensión fue perfectamente acoplado en los extremos proximal y distal. La membrana de colagena que recubrio el nadamio permitio proteger el andamio de la invaginacion de fibroblastos a la zona intervenida, de igual manera auxilio proporcionando estabilidad al andamio en la zona intervenida. Los biomeodelos recuperaron la función de la extremidad pasados los 3 a 5 días postquirurgico, no Se presenta r on complicaciones postoperatorias ya que la dosis de antibiotico fue la indicada, de igual forma la dosis analgésica fue la recomendada y administrada por la Médico Veterinaria (figura 18).



Figura 18.

### 10.11 ANÁLISIS RADIOGRÁFICO Y TOMOGRÁFICO.

El estudio radiográfico fue realizado inmediatamente acaba la intervención quirúrgica y posteriormente al mes cumplido, el andamio a base de Quitosano con poli-L-Lisina fue adaptado tanto en tamaño como en diámetro al defecto óseo y recubierto con una membrana de colágeno para evitar la invaginación de

fibroblastos al sitio de lesión En la radiografía al primer mes pasada la intervención, Se puede apreciar la formación de un callo delgado que une o fusiona los extremos proximal y distal el cual se puede hacer referencia como un puente óseo delgado, de igual manera se formó una capa muy delgada que circunda el tejido óseo , el cual podemos llamar tejido perióstico (figura 19).



Figura 19. Estudio Radiográfico Conejo #2 que muestra el avance de la formación de callo óseo. A) radiografía Preoperatoria. B) Radiografía inmediatamente después de la intervención. C) Radiografía 1 mes

En la tomografía computarizada a 1 mes, se evaluó la neoformación ósea inmediatamente después del deceso de los 2 animales, los cuales se aprecian desde diferentes ángulos y vistas en el área de la formación del callo óseo o también llamado puente óseo el cual se encuentra fusionando las porciones mencionadas anteriormente (figura 20 y 21).



Figura 20. Tomografías Computarizada (Cone Beam) Conejo #2 que muestra el avance de la formación de callo óseo 1 mes

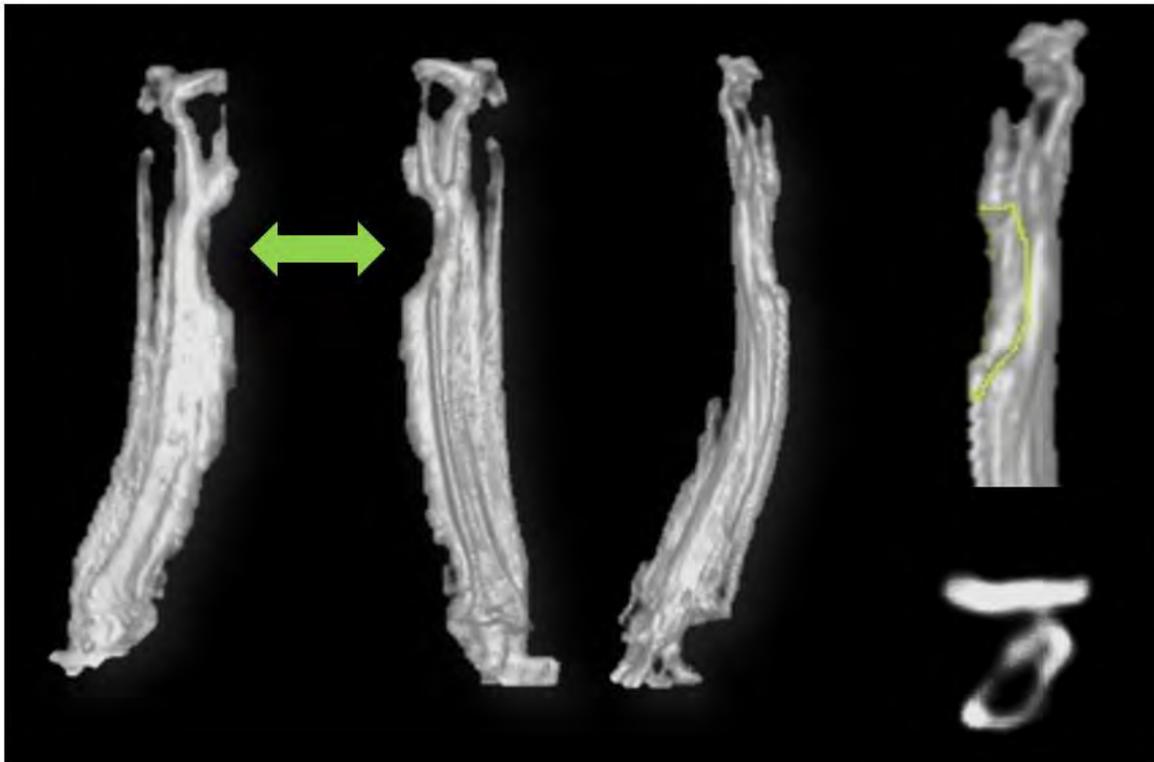


Figura 21. Tomografía Computarizada (Cone Beam) Conejo #2 muestra el avance de la formación de callo óseo 1mes

### 10.12 ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

El análisis histológico del grupo control mostró el tejido esponjoso con células hematopoyéticas y tejido graso, se aprecia hueso trabecular con su respectivo canal medular. En el hueso trabecular se observan lagunas óseas donde yacen los osteocitos tanto jóvenes como maduros, mientras más cercanos al tejido medular más joven son los osteocitos. El osteocito se encuentra recubierto por su matriz ósea u osteoide. Hay presencia de osteonas o sistema de Havers los cuales poseen en su interior un paquete vascular; el canal medular posee células grasas y se encuentra distribuidas a través de toda la médula con los elementos hematopoyéticos. En la figura A se puede apreciar un panorama general del tejido óseo y su respectivo canal medular; figura B se aprecia en el canal medular con las células tanto hematopoyéticas como células grasas. Esta condición es favorable en tejido medular joven ya que hay menor presencia de grasa. En la figura C se aprecia la trabécula ósea con todos sus componentes celulares descritos anteriormente y en la figura D se observa la combinación de ambas estructuras (figura 22). En la figura E se describen los componentes celulares de la trabécula ósea, y finalmente en la figura F se muestra el tejido medular con células adiposas y hematopoyéticas (figura 23 y 24).

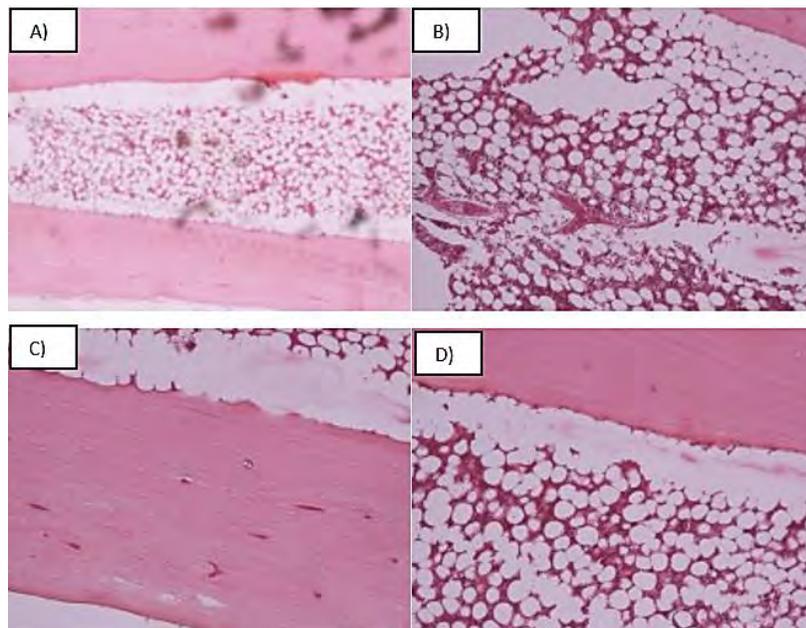
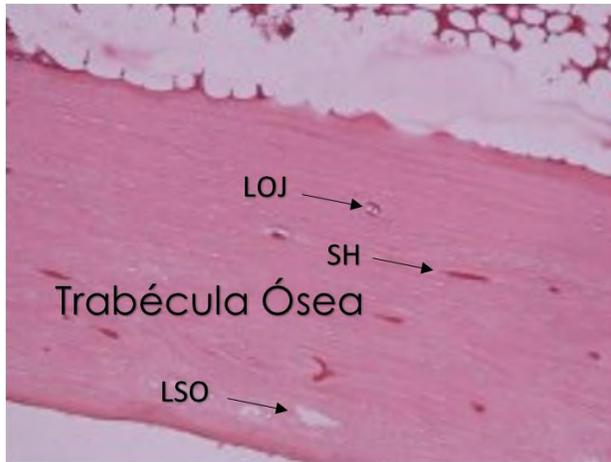


Figura 22. Histología H&E grupo control



(LOJ) Lagunas óseas que contienen osteocitos jóvenes.

(SH) Osteona o sistema de Havers

(LSO) Lagunas óseas que no contienen osteocitos.

Figura 23. Trabécula ósea con sus componentes celulares.

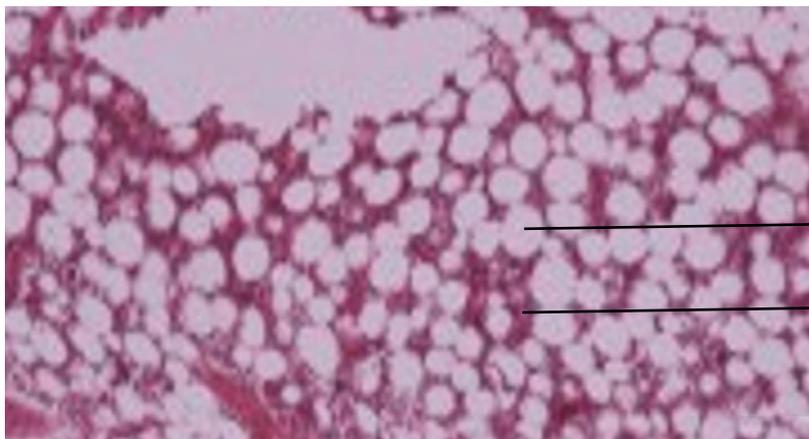


Figura 24. Muestra los componentes del tejido medular

En tanto que el análisis histológico de los grupos experimentales por medio de la tinción con Hematoxilina & Eosina en el área del defecto demostró la formación de puente óseo, delgado, conformado por tejido inmaduro, desorganizado, y con la presencia de vasos sanguíneos, osteoblastos jóvenes, por lo que inicia la secreción de su matriz ósea y la formación de lagunas ósea. El corte realizado en el área del defecto óseo demuestra a las fibras colágenas teñidas de color rosa por las regiones básicas de la eosina como se muestra en la figura 25 y 26.

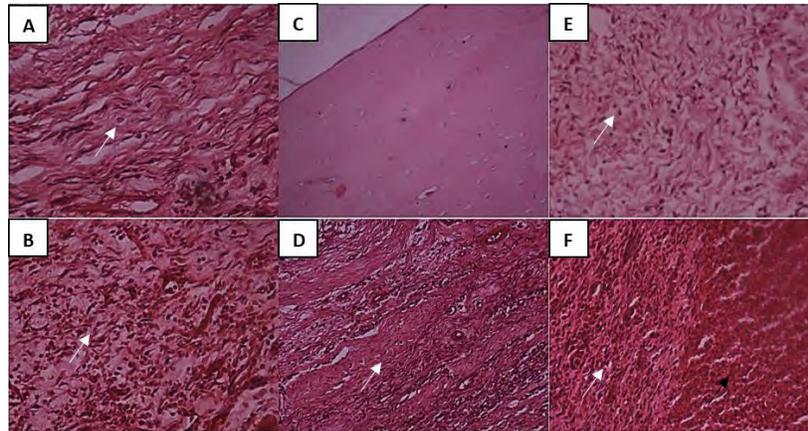


Figura 25. (A, B, D, E) Las flechas blancas delgadas muestra la estructura del tejido óseo desorganizado, osteoblastos jóvenes, C) Se muestra los osteoblastos jóvenes a lo largo del tejido óseo maduro F) La flecha gruesa color negra indica la presencia de infiltrado celular inflamatorio que rodea al tejido óseo inmaduro señalado por una flecha color blanca.

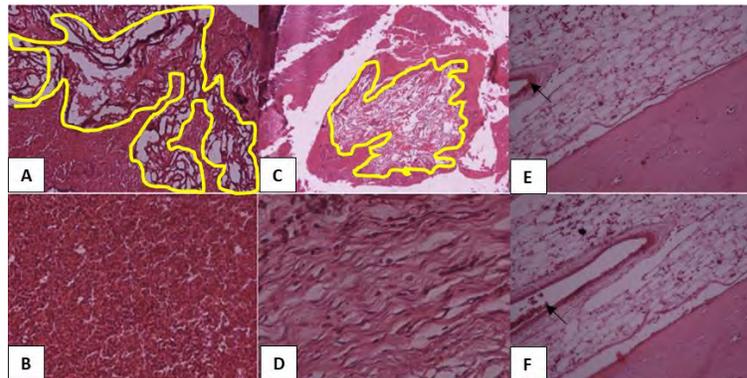


Figura 26 (A, C) Lo que se encuentra dentro del contorno amarillo demuestra la porción que no alcanzó a degradarse del andamio a base de Quitosano. B) La imagen muestra el infiltrado celular inflamatorio que rodea al tejido óseo inmaduro. D) Tejido óseo inmaduro y desorganizado. E, F) la flecha negra muestra la formación de vasos y componentes sanguíneos.



## 11. DISCUSIÓN

Existen numerosas técnicas de obtención de células madre mesenquimales provenientes de médula ósea. Así como diferencias entre los sitios anatómicos entre las diferentes especies, humanos y animales. El presente estudio demostró que la técnica de obtención de médula ósea por medio de aguja tipo Ossgood en la epífisis distal Femoral resultó efectiva ya que se pudieron obtener 5 ml de médula ósea, sin presencia de complicaciones postoperatorias la presencia de células madre mesenquimales en la porción distal de la epífisis femoral, las cuales presentaron adherencia al plástico, como de igual forma fue demostrado por Piñero Eça et al., (2009) donde concluyeron que la obtención de células monucleadas de médula ósea de conejo Nueva Zelanda proveniente de la epífisis femoral fue satisfactoriamente mayor que las provenientes de cresta iliaca, demostraron que el número de células mononucleares obtenidas fue mayor que las de cresta iliaca ( $12.10^6 \geq 3,6.10^6$ ) ya que sólo se pudieron obtener 1 ml en comparación con la epífisis femoral de cual lograron obtener 3 ml por conejo, a diferencia de lo reportado por Narbona-Carceles, Vaquero, B S, Forriol, & Fernández-Santos, (2014) donde demostraron que la cresta iliaca es la mejor región anatómica de obtención de médula ósea en humano; al compararlo con la metáfisis distal de hueso femoral y la tibia en su porción proximal, sus resultados revelaron que de cresta iliaca obtuvieron aproximadamente 6 millones de células mononucleadas a diferencia de la tibia y fémur donde el número de células mononucleadas fue significativamente menor. La prueba de viabilidad por medio de azul Trypan reveló el porcentaje de viabilidad, la cual fue mayor en las células de cresta iliaca el cual fue de 90.95%, de fémur fue 81.18% y para tibia de 83.63%. Demostrando así que la cresta iliaca es una buena fuente para la obtención de células mesenquimales en humanos. Al igual que muchos investigadores, han considerado al fémur como una fuente de células madre mesenquimales. Nuestros resultados obtenidos indicaron que la técnica de obtención del anillo celular compuesto por células mononucleadas mediante centrifugación de gradientes sin ningún tratamiento demostró ser una técnica efectiva ya que fue posible su separación del resto de los componentes sanguíneos para su posterior cultivo. Un número considerable de autores de artículos científicos han demostrado que la



técnica de aislamiento de células sin ningún tratamiento es una técnica efectiva para aislar células mesenquimales de médula ósea, ya que las células crecen de manera estable *in vitro*, poseen una rápida tasa de proliferación y poca probabilidad de contaminación, en comparación con las diferentes técnicas de aislamiento (Al-Qaisy, 2014; El Backly et al., 2015; He, Jin, & Ma, 2012; Hideki, 2013; Nadri, Soleimani, Hosseni, Massumi, & Atashi, 2007; Shafiee et al., 2011; Weidong Zhang et al., 2014). Zhang et al en el 2014 explican que cuando las células se encuentran en combinación con abundantes eritrocitos y plaquetas, estas liberan factores de crecimiento los cuales promueven tanto un microambiente parecido al original como el crecimiento de colonias. Sin embargo, Heidiki en el 2013 concluye que, no obstante, que la técnica de aislamiento de células madre mesenquimales sin tratamiento es la mejor técnica, es importante estudiar y conocer a detalle las diferentes técnicas existentes. El mismo autor menciona que si el propósito es la ingeniería de tejidos óseos, la técnica de aislamiento por Hemólisis es mejor, debido a que las células madre de médula ósea poseen un mayor contenido de células osteogénicamente comprometidas, y por otro lado, las células madre obtenidas por técnicas de centrifugación de gradientes son mejores para los tratamiento de enfermedades no óseas, ya que esta técnica ofrece mayor número de células no comprometidas.

Nadri et al., 2007; Shafiee et al., 2011) manifestaron que el fémur representa una opción válida para la obtención de médula ósea, no obstante que su técnica de obtención fue diferente a la empleada en el presente estudio, el aislamiento de células madre mesenquimales sin ningún tratamiento, resultó una técnica efectiva ya que en el plazo de 7 días lograron la observación de colonias clonogénicas por medio de la tinción cristal violeta y la caracterización de las células por medio de diversos anticuerpos por citometría de flujo.

En nuestra investigación reportamos la obtención de colonias clonogénicas a partir del séptimo día, en la cual contabilizamos 12 colonias y para el día 14 contabilizamos 53 colonias al igual que lo demostraron H.-S. Lee et al., (2003), en su estudio reportaron que obtuvieron médula ósea de fémur y observaron colonias



a partir del séptimo día hasta las 2 semanas, en donde se observaron 20 colonias. Por medio de citometría de flujo y anticuerpos específicos se caracterizaron las células mesenquimales obtenidas.

En lo que respecta a la técnica de viabilidad por medio de LIVE/DEAD, en este estudio se demostró la viabilidad que poseen las células madre mesenquimales de médula ósea de conejo por medio de la actividad esterasa intracelular evaluada a 3, 7, 14 y 21 días. La técnica de viabilidad por medio de LIVE/DEAD demostró que es una técnica efectiva con y sin andamio, ya que logró evaluar la morfología celular, y la viabilidad de las mismas por medio de fluorescencia. Porter, Henson, & Popat, 2009) demostraron por medio de esta misma prueba la viabilidad, adhesión y la morfología de células madre mesenquimales a 1, 4 y 7 días, recolectada de ratas Wistar, y sembradas sobre diferentes andamios, las cuales demostraron que las células adheridas a los andamios de Policaprolactona expresan mayores niveles de viabilidad, a diferencia del poliestireno en el día 4. De igual manera Rampichová et al., 2013) y colaboradores por medio de la prueba de viabilidad *LIVE/DEAD*, evaluaron la viabilidad celular sobre andamios 2D y 3D a base de policaprolactona (PCL) a 1, 4 y 7 días, donde al séptimo día, las células madre mesenquimales sembradas en andamios 3D exhibieron un fuerte grado de fluorescencia a diferencia de las sembradas sobre el andamio 2D.

En este estudio, la actividad metabólica mitocondrial fue medida por medio de la prueba MTT y AB de igual forma, con y sin andamio, donde se demostró la actividad proliferativa que poseen las células madre mesenquimales de médula ósea de conejo por medio de la reducción de dichas sales a través de las mitocondrias. A partir del tercer pasaje celular, las células fueron evaluadas a 3, 7, 14 días, en el que se demostraron un grado nulo de citotoxicidad en el andamio a base de Quitosano. En este sentido, los resultados de esta técnica corrobora lo que Wang y colaboradores por medio del ensayo MTT demostraron la tasa de proliferación de dos constructos tisulares a base de nano-hidroxiapatita/poliamida (n-HA/PA) y células madre mesenquimales de médula ósea en diferentes periodos de incubación, en el que demuestran que en el día 7 de cultivo celular, el número de



células se incrementaron junto con los tiempos de cultivo y reportan que no hubo diferencias significativas en el número de células entre los dos grupos. En el día 4, en ambos grupos, el número de células se incrementó de manera considerable y posteriormente la velocidad de proliferación fue disminuyendo gradualmente (H. Wang et al., 2007). Lo demostrado anteriormente se puede comparar con los resultados obtenidos en este estudio donde por medio de las pruebas antes mencionadas la curva de crecimiento mostró la tasa de proliferación que hubo entre los diferentes días, de los cuales del día 7 al 14 se mostró el mayor crecimiento proliferativo. Sobre los andamio de quitosano la mayor tasa metabólica tanto en la prueba MTT y AB se presentó del día 7 al 14.

Las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido demostraron la ubicación espacial que poseen las células dentro del andamio de quitosano pasadas 48 horas y 7 días, donde se puede apreciar su morfología ahusada, matriz extracelular y adherencia sobre la superficie del mismo. Este hallazgo se corrobora con lo obtenido en el estudio de Wenchen y colaboradores, en donde se observaron por medio de microscopia electrónica de barrido, células madre mesenquimales sembradas pasados 2 días sobre la superficie de los andamios a base de fibras de Quitosano en el cual se puede evaluar la morfología descrita anteriormente (Ji, Zhang, Hu, & Zhang, 2013). Además, los resultados de este estudio son equiparados con los resultados de Milagres y colaboradores, pues visualizaron por medio de SEM células mononucleadas adherentes de médula ósea de rata sobre membranas de colágeno, en la cuales se puede apreciar su adherencia y la morfología ahusada (Milagres et al., 2009). De igual forma, varias investigaciones han identificado, como en esta investigación a las células madre mesenquimales sobre la superficie de andamios a base de Quitosano, en la cual describen la adherencia que posee, morfología, ubicación y tamaño aproximado (G. Wang et al., 2011; Weir & Xu, 2010; Yang et al., 2014)

La técnica de Inmunofenotipificación con el marcador de membrana específico CD 44 aplicada en este estudio demostró que es el marcador positivo por excelencia para células madre mesenquimales de médula ósea y corresponde a uno de los



pocos marcadores que se expresa tanto en conejos como en humanos. El resultado de este estudio con respecto al marcador de membrana referido se relaciona positivamente con el estudio de Lee y colaboradores en el que demostraron que el mencionado anticuerpo posee un grado de reactividad del  $99.21 \pm 0.47$  en humanos al igual que el CD59 que posee un  $99.94 \pm 0.04$  de reactividad, CD105 posee  $99.28 \pm 0.34$ , siendo estos los anticuerpos que presentan mayor positividad para células madre mesenquimales esto al compararlo con 25 marcadores de membrana, el anticuerpo CD44 representa una de la amplia gama de anticuerpos positivos para células madre mesenquimales (T. C. Lee et al., 2014). Hay otro estudio en el que Arpornmaeklong, Brown, Wang, & Krebsbach, en el 2009, a través de citometría de flujo (FACS) y de distintos anticuerpos, (CD29, CD44, CD49a, CD49e, CD73, CD90, CD105, CD166 y STRO-1), fueron aplicados en células madre mesenquimales, demostrando su positividad; a diferencia del CD34 y CD45 que observaron negatividad para células mesenquimales y positivos para células hematopoyéticas (Arpornmaeklong, Brown, Wang, & Krebsbach, 2009). De igual forma en otro estudio realizado por Boxall y Jones en el 2012, caracterizaron células madre mesenquimales de médula ósea en diversas especies animales, y en el que concluyen que el anticuerpo CD44, está involucrado en numerosas funciones, como es la interacción de la matriz extracelular, la adhesión, la formación de matriz, la resistencia apoptósica y el *homing*. Además, se demostró que es positivo para humano, ratón, rata, conejo, perro, cerdo, oveja, vaca y un porcentaje menor en el caballo. Estos autores también demostraron que el CD44 es positivo a los linajes linfóide, mieloide, endotelial, eritroide y así como a las células madre hematopoyéticas (Lewinsohn, Nagler, Ginzton, Greenberg, & Butcher, 1990). En el presente estudio, los resultados demostraron que el anticuerpo CD44 fue positivo para las células madre mesenquimal es de un tercer pasaje aisladas de médula ósea purificadas, como se demuestra en la literatura científica antes mencionada, así como la ausencia de fluorescencia al anticuerpo CD34, lo que demuestra que este anticuerpo es negativo para células madre mesenquimales.

El andamio favoreció la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que dará origen a la formación del tejido medular, como ocurrió en el estudio de (Jang, Franco,



Sarkar, & Lee, 2014). En el presente estudio se realizó la evaluación de defectos óseos por medio de constructo tisular a base de células madre mesenquimales en conjunto con andamio a base de Quitosano/Poli-L-Lisina donde demostramos la capacidad que posee este materia para guiar la regeneración de tejido óseo, la nula toxicidad y la rápida degradabilidad como lo han observado un amplio número de investigadores (Ajalloueian, 2015; Amaral et al., 2005; C. Chen, Dong, & Cheung, 2005; Guzmán et al., 2014; Hu et al., 2004; Levengood & Zhang, 2014; Suzana C.C.C. Miranda et al., 2011; Seol et al., 2004; Yang et al., 2014; Yu et al., 2007; Zheng et al., 2008).

El estudio radiográfico y tomográfico demostraron el proceso de fusión que hubo de los segmentos óseos o “sinostosis”. Se observó la formación de un puente óseo delgado después de un mes, uniendo los dos extremos, demostrando así la capacidad que posee el andamio a base de quitosano para favorecer como primera intención la adhesión celular, la secreción de su matriz extracelular, la diferenciación de células madre mesenquimales hacia linaje óseo, y de igual forma la habilidad de degradarse originar al nuevo tejido, así como la baja toxicidad que presenta al implantarse *in vivo*. Estos resultados se comparan con los obtenidos en el estudio de Levengood y Zhang que demostraron la capacidad osteogénica que posee el material a base de Quitosano, su nula toxicidad, la versatilidad que posee para elaborarlo en diversas estructuras, la capacidad que posee para generar vasos sanguíneos, empleado en biomodelos. Este ensayo se observó por medio de análisis radiográfico, microtomográfico y análisis histológico en los cuales describen la neoformación ósea en forma de puente uniendo los segmentos proximales, y donde el tejido óseo desmineralizado se tiñe de color rosa y el osteocito se tiñe de color azul a través de la matriz ósea (Levengood & Zhang, 2014). Por otra parte los hallazgos radiográficos de este estudio se equiparan con los encontrados en la investigación desarrollada por El Backly y colaboradores en el 2015 que demostraron la regeneración ósea llevada a cabo en conejos donde realizaron un defecto de tamaño crítico cubital, por medio de radiografías, estudio microtomográfico e histológico, en los que demostraron la fusión de los segmentos proximal y distal, a través de andamios cilíndricos de nanohidroxiapatita y poliéster



uretano en combinación con células madre mesenquimales de médula ósea. Además señalaron, que es importante recubrir el constructo tisular por medio de una membrana con el fin de crear un espacio, para que las células no osteogénicas invadan la neoformación. Esta técnica de recubrimiento puede ser usada con el fin de favorecer la reparación endógena ósea mediada por el periostio (El Backly et al., 2015). De igual manera, los resultados de este estudio se comparan con los desarrollados por Fialkov y colaboradores, pues llevaron a cabo un estudio en conejos Nueva Zelanda donde realizaron un defecto de tamaño crítico femoral por medio del empleo de andamio a base de ácido poliglicólico y células madre mesenquimales provenientes de cresta iliaca. También se realizaron estudio radiográficos, Tomográficos e histológico, en los cuales concluyeron que la combinación de andamio a base de ácido poliglicólico, con células madre mesenquimales es una estrategia prometedora en el campo de la reconstrucción de defectos óseos (Fialkov, Holy, Shoichet, & Davies, 2003).

En este estudio, el análisis de los resultados histológicos por medio de la técnica de tinción Hematoxilina y Eosina, mostraron la formación de callo óseo delgado uniendo los dos extremos tanto proximal como distal. El análisis histológico demostró la formación de un puente óseo que por medio de anastomosis fusiona las extremos, el tejido óseo formado, fue un tejido inmaduro, completamente desorganizado, el cual fue teñido en su mayoría por la Eosina, por la alta afinidad que posee hacia el colágeno, de igual forma encontramos osteoblastos jóvenes en su mayoría, donde los núcleos son teñidos de azul y el citoplasma de rosaal igual que el tejido fibroso. Estos resultados son corroborados con los obtenidos en las investigaciones de (El Backly et al., 2015; Suzana C C C Miranda et al., 2012; Suzana C.C.C. Miranda et al., 2011; Spicer et al., 2013). Por otra parte en nuestro estudio se observó la presencia de una capsula fibrosa con un ligero infiltrado celular localizado en la periferia de la neoformación ósea, lo que corrobora lo obtenido por (Guzmán et al., 2014). Además, la tinción histológica de este estudio demostró el proceso de regeneración ósea, el cual se presenta de la misma manera en la osificación endocondral.



## 12. CONCLUSIONES

La médula ósea de la porción distal de la epífisis femoral representa una fuente prometedora para la obtención de células madre mesenquimales, ya que estas células fueron viables y presentaron una tasa metabólica alta.

La técnica de obtención de médula ósea por medio de aguja tipo Ossgood y punción en epífisis distal femoral, fue eficiente ya que se logró aspirar 5ml totales de médula ósea.

La técnica de aislamiento por medio de separación por densidad de gradientes y sin ningún tratamiento fue exitosa pues se logró obtener exitosamente el anillo celular compuesto por células mononucleadas, y así tener la posibilidad de aislar células mesenquimales.

Las células madre de medula ósea poseen una capacidad clonogénica, que quedó demostrada por medio de la tinción Azul de Toluidina, que identifico colonias clonogénicas *in vitro*.

Las células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea fueron identificadas por medio de inmunomarcadores como fue el CD44.

Los marcadores de membrana específicos empleados permitieron la inmunoidentificación y aislamiento de células madre mesenquimales, de un población heterogénea, y así reducirla a poblaciones homogéneas.

El marcador de membrana CD44 por medio de fluorescencia, constituye un marcador específico para células madre mesenquimales a diferencia del marcador de 34 el cual es un marcador negativo para identificar células madre mesenquimales en un tercer pasaje.

El andamio a base de Quitosano es un biomaterial que provee estabilidad, soporte, adhesión y compatibilidad a las células madre mesenquimales.



El andamio a base de Quitosano es un biomaterial, por lo tanto, eficaz y eficiente para el empleo en ingeniería de tejido óseo, ya que posee una rápida degradación *in vivo*,

Es fundamental colocar una barrera física que cubra por completo al constructo tisular, ya que sin ella, las células inflamatorias, fibroblastos y demás, invadirían al tejido neoformado y no permitiría que las células diferenciadas regeneren completamente.

En la actualidad existen una diversidad amplia de andamios, que se encargan de propiciar el proceso de regeneración ósea, pero no hay estudios que demuestren a un “material ideal” en la ingeniería de tejidos óseos, sin embargo este estudio demostró el potencial que posee el Quitosano como material adecuado en la ingeniería de tejidos óseos.



### 13. REFERENCIAS

- Ajallouelian, F. (2015). Investigation of Human Mesenchymal Stromal Cells Cultured on PLGA or PLGA/Chitosan Electrospun Nanofibers. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 05(6). doi:10.4172/2155-9821.1000230
- Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, 10, 96–101. doi:10.1007/s005860100282
- Alegre Aguarón, E., Desportes, P., García Álvarez, F., Castiella, T., Larrad, L., & Martínez Lorenzo, M. J. (2012). Differences in Surface Marker Expression and Chondrogenic Potential among Various Tissue-Derived Mesenchymal Cells from Elderly Patients with Osteoarthritis. *Cells Tissue Organs*, 196(1), 231–240. doi:10.1159/000334400
- Al-Qaisy, B. a. (2014). Comparison between three different protocols for isolation and culture of mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*, 7(1), 26–35.
- Amaral, I. F., Lamghari, M., Sousa, S. R., Sampaio, P., & Barbosa, M. a. (2005). Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: the effect of the degree of acetylation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 75, 387–97. doi:10.1002/jbm.a.30436
- Arpornmaeklong, P., Brown, S. E., Wang, Z., & Krebsbach, P. H. (2009). Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 18(7), 955–968. doi:10.1089/scd.2008.0310
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. . (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med*, 8(3), 301–316.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., & Robey, P. G. (2001). Bone marrow



stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19, 180–192. doi:10.1634/stemcells.19-3-180

- Bolander, M. E. (1992). Regulation of Fracture Repair by Growth Factors. *Experimental Biology and Medicine*, 200, 165–170. doi:10.3181/00379727-200-43410A
- Bourzac, C., Smith, L. C., Vincent, P., Beauchamp, G., Lavoie, J. P., & Laverty, S. (2010). Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Veterinary Journal*, 42, 519–527. doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00098.x
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., & Peterson, L. (1994). Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 331(2), 889–895. doi:10.1056/NEJM199410063311401
- Broccaioli, E., Niada, S., Rasperini, G., Ferreira, L. M., Arrigoni, E., Yenagi, V., & Brini, A. T. (2013). Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad: *In Vitro* Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. *BioResearch Open Access*, 2(2), 107–117. doi:10.1089/biores.2012.0291
- Brohem, C. a., De Carvalho, C. M., Radoski, C. L., Santi, F. C., Baptista, M. C., Swinka, B. B., ... Lorencini, M. (2013). Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, 448–457. doi:10.1111/ics.12064
- Bueno, D. F., Kerkis, I., Costa, A. M., Martins, M. T., Kobayashi, G. S., Zucconi, E., ... Passos-Bueno, M. R. (2009). New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. *Tissue Engineering. Part A*, 15(00), 427–435. doi:10.1089/ten.tea.2007.0417
- Bunnell, B. a, Estes, B. T., Guilak, F., & Gimble, J. M. (2008). Differentiation of adipose stem cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 456, 155–171. doi:10.1007/978-1-59745-245-8\_12
- Caballero, M., Pappa, A., Roden, K., Krochmal, D. J., & van Aaist, J. A. (2015).



Osteoinduction of Umbilical Cord and Palate Periosteum- Derived Mesenchymal Stem Cells on Poly-Co-Glycolytic Acid Nano-Microfibers. *Ann Plast Surg*, 72(0 2), 1–20.

doi:10.1097/SAP.000000000000107.Osteoinduction

- Can, a. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*, 25, 57–59. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-48649087453&partnerID=40&md5=d00ce53253367ba507f9247450405bdd>
- Caplan, A. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9, 641–50. doi:10.1002/jor.1100090504
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(S4), 467–479. doi:10.1007/s00586-008-0745-3
- Chase, L. C. G., Rao, M. S. G., & Vemuri, M. S. (2011). Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications Methods in Molecular Biology, 698(9), 534. doi:10.1007/978-1-60761-999-4
- Chen, C., Dong, L., & Cheung, M. K. (2005). Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)/chitosan blends. *European Polymer Journal*, 41, 958–966. doi:10.1016/j.eurpolymj.2004.12.002
- Chen, Y., Bai, B., Zhang, S., Ye, J., Zhai, H., Chen, Y., ... Zeng, Y. (2014). Study of a novel three-dimensional scaffold to repair bone defect in rabbit. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 102(5), 1294–304. doi:10.1002/jbm.a.34788
- Choi, K.-M., Seo, Y.-K., Yoon, H.-H., Song, K.-Y., Kwon, S.-Y., Lee, H.-S., & Park, J.-K. (2008). Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(6), 586–594. doi:10.1263/jbb.105.586
- Coelho, M. J., & Fernandes, M. H. (2000). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate



and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 21, 1095–1102. doi:S0142-9612(99)00192-1 [pii]

- Di Martino, A., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan : A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26, 5983–5990. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.016
- Doblaré, M., García, J. M., & Gómez, M. J. (2004). Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, 71, 1809–1840. doi:10.1016/j.engfracmech.2003.08.003
- Doherty, M. J., Ashton, B. a, Walsh, S., Beresford, J. N., Grant, M. E., & Canfield, a E. (1998). Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 13(5), 828–838. doi:10.1359/jbmr.1998.13.5.828
- Dominici, M., Blanc, K. Le, Mueller, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- El Backly, R. M., Chiapale, D., Muraglia, A., Tromba, G., Ottonello, C., Santolini, F., ... Mastrogiacomo, M. (2015). A Modified Rabbit Ulna Defect Model for Evaluating Periosteal Substitutes in Bone Engineering: A Pilot Study. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2(January), 1–8. doi:10.3389/fbioe.2014.00080
- El-Din, S., & Saber, M. (2009). Tissue engineering in endodontics. *Journal of Oral Science*, 51(4), 495–507.
- El-Sayed, K. M. F., Paris, S., Graetz, C., Kassem, N., Mekhemar, M., Ungefroren, H., ... Dörfer, C. (2014). Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS(+) and MACS(-) cell populations. *International Journal of Oral Science*, (June), 1–9. doi:10.1038/ijos.2014.41
- Emoke, P., Simona, C., Groza, I. S., Cenariu, M., Mihaela, N., & Roman, A. (2012).



COMPARATIVE PHENOTYPIC ASSESSMENT OF PALATAL SUBEPITHELIAL CONNECTIVE TISSUE ISOLATED FROM DOG AND HUMAN The aim of this study was to isolate and assess the multipotent characteristics of MSCs dog and human in order to cover gingival recessions in future. *Veterinary Medicine Journal*, 58(3), 190–193.

Fawzy El-Sayed, K. M., Paris, S., Becker, S., Kassem, N., Ungefroren, H., Fändrich, F., ... Dörfer, C. (2012). Isolation and characterization of multipotent postnatal stem/progenitor cells from human alveolar bone proper. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery : Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 40(8), 735–42. doi:10.1016/j.jcms.2012.01.010

Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Del Canto Pingarrón, M., & Blanco Jerez, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 11(1), 32–36.

Fialkov, J. A., Holy, C. E., Shoichet, M. S., & Davies, J. E. (2003). In Vivo Bone Engineering in a Rabbit Femur. *THE JOURNAL OF CRANIOFACIAL SURGERY*, 14, 324–332.

Florczyk, S. J., Leung, M., Li, Z., Huang, J. I., Hopper, R. a., & Zhang, M. (2013). Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101, 2974–2983. doi:10.1002/jbm.a.34593

Friedenstein, A. (2010). Stromal-Hematopoietic Interrelationships : Maximov ' s Ideas and Modern Models. *Cellular Therapy and Trasplantation (CTT)*, 1(3), 25–30. doi:10.3205/ctt-2009-en-000033.01

Gebler, A., Zabel, O., & Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in Molecular Medicine*, 18(2), 128–134. doi:10.1016/j.molmed.2011.10.004

Giannoudis, P. V., Einhorn, T. a., & Marsh, D. (2007). Fracture healing: A harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury*, 38, S1–S2. doi:10.1016/S0020-



1383(08)70002-0

- Grimm, W. D., Dannan, A., Giesenhagen, B., Schau, I., Varga, G., Vukovic, M. A., & Sirak, S. V. (2014). Translational Research: Palatal-derived Ectomesenchymal Stem Cells from Human Palate: A New Hope for Alveolar Bone and Cranio-Facial Bone Reconstruction. *International Journal of Stem Cells*, 7(1), 23–9. doi:10.15283/ijsc.2014.7.1.23
- Gronthos, S., Mankani, M., & Brahimi, J. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*, 97(25), 13625–13630.
- Grundnes, O., & Reikerås, O. (1993). The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica*, 64(November), 340–342. doi:10.3109/17453679308993640
- Grundnes, O., & Reikerås, O. (1993). The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 64(November), 47–49. doi:10.3109/17453679308994527
- Gudleviciene, Z., Kundrotas, G., Liudkeviciene, R., Rascon, J., & Jurga, M. (2015). Quick and effective method of bone marrow mesenchymal stem cell extraction. *Open Med*, 10, 44–49. doi:10.1515/med-2015-0008
- Gurevitch, O., Slavin, S., Resnick, I., Khitrin, S., & Feldman, A. (2009). Mesenchymal Progenitor Cells in Red and Yellow Bone Marrow. *Folia Biologica(Praha)*, 55(1), 27–34. doi:FB2009A0006 [pii]
- Guzmán, R., Nardecchia, S., Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Ramos, V., del Monte, F., ... López-Lacomba, J. L. (2014). Chitosan scaffolds containing calcium phosphate salts and rhBMP-2: in vitro and in vivo testing for bone tissue regeneration. *PloS One*, 9(2), e87149. doi:10.1371/journal.pone.0087149
- Haddad, A. J., Peel, S. A. F., Clokie, C. M. L., & Sa, G. K. B. (2006). Closure of Rabbit Calvarial Critical-Sized Defects Using Protective Composite Allogeneic and Alloplastic Bone Substitutes.
- Haddad, R., & Saldanha-Araujo, F. (2014). Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So



- Far? *BioMed Research International*, 2014, 1–14. doi:10.1155/2014/216806
- Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092, 385–396. doi:10.1196/annals.1365.035
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 12. doi:10.1186/1478-811X-9-12
- He, C., Jin, X., & Ma, P. X. (2012). Calcium phosphate deposition rate, structure and L osteoconductivity on electrospun poly(-lactic acid) matrix using electrodeposition or simulated body fluid incubation. *Acta Biomater*, 29(1), 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
- Hideki, A. (2013). Isolation of Bone Marrow Stromal Cells: Cellular Composition is Technique-Dependent. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, 37–50.
- Hu, Q., Li, B., Wang, M., & Shen, J. (2004). Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: A potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, 25, 779–785. doi:10.1016/S0142-9612(03)00582-9
- Huang, A. H.-C., Chen, Y.-K., Lin, L.-M., Shieh, T.-Y., & Chan, A. W.-S. (2008). Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 37(9), 571–4. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00654.x
- Jang, D.-W., Franco, R. A., Sarkar, S. K., & Lee, B.-T. (2014). Fabrication of porous hydroxyapatite scaffolds as artificial bone preform and its biocompatibility evaluation. *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*, 60, 216–23. doi:10.1097/MAT.0000000000000032
- Ji, W., Zhang, Y., Hu, S., & Zhang, Y. (2013). Biocompatibility study of a silk fibroin-chitosan scaffold with adipose tissue-derived stem cells in vitro. *Exp*



*Ther Med.*, 6(2), 513–518. doi:10.3892/etm.2013.1185

- Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sarlboyaci, A. E., Kaymaz, F., & Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: Ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and Cell Biology*, 132, 533–546. doi:10.1007/s00418-009-0629-6
- Khor, E., & Lim, L. Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24, 2339–2349. doi:10.1016/S0142-9612(03)00026-7
- Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S. a., Bianco, P., & Geron Robey, P. (1999). Bone Marrow Stromal Cells: Characterization and Clinical Application. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 10, 165–181. doi:10.1177/10454411990100020401
- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 4, 117. doi:10.1186/scrt328
- Lee, H.-S., Huang, G.-T., Chiang, H., Chiou, L.-L., Chen, M.-H., Hsieh, C.-H., & Jiang, C.-C. (2003). Multipotential Mesenchymal Stem Cells from Femoral Bone Marrow Near the Site of Osteonecrosis. *Stem Cells*, 21(7), 190–199.
- Lee, T. C., Lee, T. H., Huang, Y. H., Chang, N. K., Lin, Y. J., Chang Chien, P. W., ... Chu, L. M. H. (2014). Comparison of Surface Markers between Human and Rabbit Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 9(11), e111390. doi:10.1371/journal.pone.0111390
- Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 3161. doi:10.1039/c4tb00027g
- Lewinsohn, D. M., Nagler, a, Ginzton, N., Greenberg, P., & Butcher, E. C. (1990). Hematopoietic progenitor cell expression of the H-CAM (CD44) homing-associated adhesion molecule. *Blood*, 75(3), 589–595.
- Liu, H.-C., E, L.-L., Wang, D.-S., Su, F., Wu, X., Shi, Z.-P., ... Wang, J.-Z. (2011).



Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Engineering. Part A*, 17(19-20), 2417–33. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0620

Makker, K., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2008). Magnetic Activated Cell Sorting (MACS): Utility in assisted reproduction. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46(July), 491–497.

Maria, O. M., Khosravi, R., Mezey, E., & Tran, S. D. (2007). Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Diseases*, 13, 11–16. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01324.x

McCullen, S. D., Zhu, Y., Bernacki, S. H., Narayan, R. J., Pourdeyhimi, B., Gorga, R. E., & Lobo, E. G. (2009). Electrospun composite poly(L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 4(3), 035002. doi:10.1088/1748-6041/4/3/035002

McCulloch, C. a, & Tenenbaum, H. C. (1986). Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *The Anatomical Record*, 215, 397–402. doi:10.1002/ar.1092150410

Milagres, D., Rueff-Barroso, C. R., Carvalho, S. N., Carvalho, L. De, Monte-Alto-Costa, A., Fischer, R. G., & Porto, L. C. (2009). Early Proliferation of Bone Marrow Mononuclear Cells on Collagen Membrane, Bone Graft and Tooth Cementum. *International Journal of Morphology*, 27(4), 1249–1256. doi:10.4067/S0717-95022009000400045

Miranda, S. C. C. C., Silva, G. a B., Mendes, R. M., Abreu, F. A. M., Caliani, M. V., Alves, J. B., & Goes, A. M. (2012). Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: A potential strategy for alveolar bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2775–2786. doi:10.1002/jbm.a.34214

Miranda, S. C. C. C., Silva, G. A. B., Hell, R. C. R., Martins, M. D., Alves, J. B., & Goes, A. M. (2011). Three-dimensional culture of rat BMSCs in a porous



chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. *Archives of Oral Biology*, 56(1), 1–15.

doi:10.1016/j.archoralbio.2010.08.018

Moharamzadeh, K., Brook, I. M., Noort, R. Van, Scutt, A. M., & Thornhill, M. H. (2015). CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE Tissue-engineered Oral Mucosa : a Review of the Scientific Literature, 115–124.

Morandi, F., Raffaghello, L., Bianchi, G., Meloni, F., Salis, A., Millo, E., ... Pistoia, V. (2008). Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells*, 26, 1275–1287. doi:10.1634/stemcells.2007-0878

Morsczeck, C., Petersen, J., Völlner, F., Driemel, O., Reichert, T., & Beck, H. C. (2009). Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells. *Electrophoresis*, 30, 1175–84. doi:10.1002/elps.200800796

Morsczeck, C., Völlner, F., Saugspier, M., Brandl, C., Reichert, T. E., Driemel, O., & Schmalz, G. (2010). Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clinical Oral Investigations*, 14, 433–440. doi:10.1007/s00784-009-0310-4

Mostafa, N. Z., Fitzsimmons, R., Major, P. W., Adesida, A., Jomha, N., Jiang, H., & Uludağ, H. (2012). Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Cultured with Dexamethasone, Vitamin D3, Basic Fibroblast Growth Factor, and Bone Morphogenetic Protein-2. *Connective Tissue Research*, 53(June 2011), 117–131. doi:10.3109/03008207.2011.611601

Muzzarelli, R. a. a., Mattioli-Belmonte, M., Tietz, C., Biagini, R., Ferioli, G., Brunelli, M. a., ... Biagini, G. (1994). Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, 15(13), 1075–1081. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0142-9612(94)90093-0

Nadri, S., Soleimani, M., Hosseni, R. H., Massumi, M., & Atashi, A. (2007). An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *International Journal of Development*, 729, 723–729.



doi:10.1387/ijdb.072352ns

Narbona-Carceles, J., Vaquero, J., B S, S. S.-S., Forriol, F., & Fernández-Santos, M. E. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cell aspirates from alternative sources Is the knee as good as the iliac crest? *Injury*, *45 Suppl 4*, S42–7.

doi:10.1016/S0020-1383(14)70009-9

Nery, A. a, Nascimento, I. C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J. E., & Ulrich, H. (2013). Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *83(1)*, 48–61.

doi:10.1002/cyto.a.22205

Ozen, A., Sancak, I. G., Tiryaki, M., Ceylan, A., Alparslan Pinarli, F., & Delibaşı, T. (2014). Mesenchymal Stem Cells (Mscs) in Scanning Electron Microscopy (SEM) World. *Niche Journal*, *2*, 22–24. doi:10.5152/niche.2013.162

Park, J.-B. (2012). The Effects of Dexamethasone, Ascorbic Acid, and  $\beta$ -Glycerophosphate on Osteoblastic Differentiation by Regulating Estrogen Receptor and Osteopontin Expression. *Journal of Surgical Research*, *173(1)*, 99–104. doi:10.1016/j.jss.2010.09.010

Park, J.-C., Kim, J.-M., Jung, I.-H., Kim, J. C., Choi, S.-H., Cho, K.-S., & Kim, C.-S. (2011). Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology*, *38(8)*, 721–31.

doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01716.x

Pereira-Junior, O. C. M., Rahal, S. C., Lima-Neto, J. F., Landim-Alvarenga, F. D. C., & Monteiro, F. O. B. (2013). In vitro evaluation of three different biomaterials as scaffolds for canine mesenchymal stem cells. *Acta Cirúrgica Brasileira / Sociedade Brasileira Para Desenvolvimento Pesquisa Em Cirurgia*, *28(5)*, 353–60. doi:S0102-86502013000500006 [pii]

Perez-Basterrechea, M., Obaya, A. J., Meana, A., Otero, J., & Esteban, M. M. (2013). Cooperation by Fibroblasts and Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells to Improve Pancreatic Rat-to-Mouse Islet Xenotransplantation. *PLoS*



ONE, 8(8), 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0073526

Pierini, M., Dozza, B., Lucarelli, E., Tazzari, P. L., Ricci, F., Remondini, D., ...

Donati, D. (2012). Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow, (November 2011), 1–8.

doi:10.3109/14653249.2012.677821

Piñero Eça, L., Belmonte Ramalho, R., Sousa Oliveira, I., Paulo, O. G., Pontes, P., Teixeira Ferreira, A., & Vaccari Mazzetti, P. M. (2009). Models , Biological Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *Animals*, 24(5), 400–404.

Pittenger, M. F., Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., ... Marshak, D. R. (2012). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 143(1999).

doi:10.1126/science.284.5411.143

Porter, J. R., Henson, A., & Papat, K. C. (2009). Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications.

*Biomaterials*, 30(5), 780–788. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.022

Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the Origin of the Term “Stem Cell.” *Cell Stem Cell*, 1, 35–38. doi:10.1016/j.stem.2007.05.013

Ramírez Hernández, P. (2009). Medicina regenerativa y células madre.

Mecanismos de acción de las células madre adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 25(1), 1–15.

Rampichová, M., Chvojka, J., Buzgo, M., Prosecká, E., Mikeš, P., Vysloužilová, L., ... Amler, E. (2013). Elastic three-dimensional poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 46, 23–37. doi:10.1111/cpr.12001

Rao, S. B., & Sharma, C. P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34(1), 21–28. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199701)34:1<21::AID-



JBM4>3.0.CO;2-P

- Rodríguez, A. M., Cabrera Galván, J. I., & De León Delgado, J. (2015). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 31(1), 20–31.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2011). *Histology A Text and Atlas* (Sexta Edic.).
- Seol, Y., Lee, J., Park, Y., Lee, Y., Lee, S., Han, S., & Chung, C. (2004). Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters*, 26, 1037–1041.
- Sfeir, C., Ho, L., Doll, B. A., Azari, K., & Hollinger, J. O. (2005). Fracture Repair. In J. . Lieberman & G. . Friedlaender (Eds.), *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications* (pp. 21–44).
- Shafiee, A., Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ahmadbeigi, N., Dinarvand, P., & Ghaemi, N. (2011). A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnology Letters*, 33, 1257–1264. doi:10.1007/s10529-011-0541-8
- Shieh, S.-J., & Vacanti, J. P. (2005). State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery*, 137(1), 1–7. doi:10.1016/j.surg.2004.04.002
- Shin, M., Yoshimoto, H., & Vacanti, J. P. (2004). In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Engineering*, 10(1), 33–41. doi:10.1089/107632704322791673
- Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(June), 4954. doi:10.1038/nature04954
- Sohni, A., & Verfaillie, C. M. (2013). Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells International*, 2013, 14–16. doi:10.1155/2013/130763
- Solchaga, L. a, Cassiède, P., & Caplan, a I. (1998). Different response to osteo-inductive agents in bone marrow- and periosteum-derived cell preparations. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 69(4), 426–432.



doi:10.3109/17453679808999061

Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T. J. (2008). Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study. *Journal of Endodontics*, 34(2), 166–171.

Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. a, Kurtis, F., & Mikos, A. G. (2013). Evaluation of Bone Regeneration Using the Rat Critical Size Calvarial Defect. *Nature Protocols*, 7(10), 1918–1929.

doi:10.1038/nprot.2012.113.Evaluation

Stanko, P., Kaiserova, K., Altanerova, V., & Altaner, C. (2014). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp , bone marrow , adipose tissue , and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158(August 2013), 373–377.

Suchánek, J., Visek, B., Soukup, T., El-Din Mohamed, S. K., Ivancaková, R., Mokry, J., ... Omran, a. (2010). Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Kralove*, 53, 93–99.

Tan, S.-L., Ahmad, T. S., Selvaratnam, L., & Kamarul, T. (2013). Isolation, characterization and the multi-lineage differentiation potential of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Anatomy*, 222(4), 437–50. doi:10.1111/joa.12032

Taylor, S. E., & Clegg, P. D. (2011). Collection and Propagation Methods for Mesenchymal Stromal Cells. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 27, 263–274. doi:10.1016/j.cveq.2011.05.003

Tosh, D., & Slack, J. M. W. (2002). How Cells Change Their Phenotype. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(March), 187–194. doi:10.1038/nrm761

Travlos, G. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology*, 34, 548–565. doi:10.1080/01926230600939856



- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European Journal of Immunology*, *36*, 2566–2573. doi:10.1002/eji.200636416
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *8*(SepTeMbeR), 726–736. doi:10.1038/nri2395
- Wang, F., Yu, M., Yan, X., Wen, Y., Zeng, Q., Yue, W., ... Pei, X. (2011). Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells and Development*, *20*(12), 2093–102. doi:10.1089/scd.2010.0523
- Wang, G., Zheng, L., Zhao, H., Miao, J., Sun, C., Ren, N., ... Tao, X. (2011). In vitro assessment of the differentiation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on genipin-chitosan conjugation scaffold with surface hydroxyapatite nanostructure for bone tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*, *17*(MAY), 1341–1349. doi:10.1089/ten.tea.2010.0497
- Wang, H., Li, Y., Zuo, Y., Li, J., Ma, S., & Cheng, L. (2007). Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *28*, 3338–3348. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.014
- Weir, M. D., & Xu, H. H. K. (2010). Culture human mesenchymal stem cells with calcium phosphate cement scaffolds for bone repair. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, *93*, 93–105. doi:10.1002/jbm.b.31563
- Wilkins, B. S. (1992). Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology. I. *Journal of Clinical Pathology*, *45*, 645–649. doi:10.1136/jcp.45.8.645
- Xiao, Y., Peperzak, V., van Rijn, L., Borst, J., & de Bruijn, J. D. (2010). Dexamethasone treatment during the expansion phase maintains stemness of bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *4*(January), 524–531. doi:10.1002/term



- Yang, J., Liu, A., Han, Y., Li, Q., Tian, J., & Zhou, C. (2014). Osteodifferentiation of mesenchymal stem cells on chitosan/hydroxyapatite composite films. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 102, 1202–9. doi:10.1002/jbm.a.34756
- Yu, H., Chen, X., Lu, T., Sun, J., Tian, H., Hu, J., & Wang, Y. (2007). Poly ( L - lysine ) -Graft-Chitosan Copolymers : Synthesis , Characterization , and Gene Transfection Effect, 1425–1435.
- Zhang, S., Qian, H., Wang, Z., Fan, J., Zhou, Q., Chen, G., ... Sun, J. (2010). Preliminary study on the freeze-drying of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 11(11), 889–894. doi:10.1631/jzus.B1000184
- Zhang, W., Zhang, F., Shi, H., Tan, R., Han, S., Ye, G., ... Liu, X. (2014). Comparisons of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell isolation and culture methods in vitro. *PLoS ONE*, 9(2). doi:10.1371/journal.pone.0088794
- Zhang, W., Zhang, F., Shi, H., Tan, R., Han, S., Ye, G., ... Liu, X. (2014). Comparisons of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Isolation and Culture Methods InVitro. *PloS One*, 9(2), 1–8.
- Zheng, Z., Zhang, L., Kong, L., Wang, A., Gong, Y., & Zhang, X. (2008). The behavior of MC3T3-E1 cells on chitosan / poly- L -lysine composite films : Effect of nanotopography , surface chemistry , and wettability. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 454–465. doi:10.1002/jbm.a.31979
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... Hendrick, M. H. (2003). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 4279–4295. doi:10.1091/mbc.E02
- Zuk, PA, E. Al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–28. doi:10.1089/107632701300062859

REFERENCIAS WORD



1. Bakhtina, A., Tohfafarosh, M., Lichtler, A., & Arinzch, T. L. (2013). Characterization and differentiation potential of rabbit meSenchymal stem cells for translational. *in vitro cells. Dev.Biol*, 1-10.
2. Boveri, T. (1892). Befruchtung. In ErgebnisSe der Anatomie und Entwicklungsgeschichte. En F. S. Merkel, & R. Bonnet. Wiesbaden: JoSeph Friedrich Bergmann.
3. Cancedda, R., Giannoni, P., & Mastrogiacomo, M. (2007). A tissue engineering approach to bone repair in large animals models and clinical practice. *Biomaterials*, 4240-4250.
4. Court-Brown, C. M., & Caesar, B. (2006). Epidemiology of adult fractures: A review. *Injury, international journal of the care of the injured*, 691-697.
5. De la Roza, G., Damron, T. A., & Murray , D. G. (2012). Histology of Bone. *Orthopaedic ReSearch and Education Foundatio*, 8.
6. Di Martino, A., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 5983-5990.
7. Ehrilche, P. (1879). Über die specifischen Granulationen des Blutes. *Archiv fur Anatomie und Physiologie*, 571-579.
8. Fawcett, D. W. (1991). *Tratado de Histologia* . Boston, MassachuSetts: Interamericana .
9. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Fralova, G. P. (1968). Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.*, 230-239.
10. GeneSer, F. (1990). *Atlas color de histología*. Munksgaard, Copenhagen: Medica Panamericana .
11. Gonsalves, R., Lobato da Silva, C., Cabral, J. M., Zanjani, E. D., & Almeida-Porada, G. (2006). A Stro-1(+) human universal stromal feeder layer to



- expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a Serum-free culture system. *Exp Hematology*, 1353-1359.
12. Haddad, A. J., Peel, S. F., Clokie, C. L., & Sandor, G. B. (2006). Closure of Rabbit Calvarial Critical-Sized defects using protective composite allogenic and alloplastic bone substitutes. *THE JOURNAL OF CRANIOFACIAL SURGERY*, 926-934.
  13. Haeckel, E. (1874). *Anthropogenie*. Leipzig: Wilhem Engelmann.
  14. Ham Cormack, D. (1988). *Histología de Ham* (Novena Edición ed.). Toronto, Canada: Harla.
  15. Hernández Ramírez, P., & Dorticós Balea, E. (18 de Diciembre de 2004). Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana Hematología.*, 20(3).
  16. Illescas Fernández, G. J. (2003). Escalas e índices de Severidad en trauma. *Trauma*, 88-94.
  17. Lee, T. C., Lee, T. H., Huang, Y. H., Chang, N. K., & Lin, Y. J. (2014). Comparison of Surface Markers between Human and Rabbit Mesenchymal Stem Cells. *Plos ONE*, 1-10.
  18. Lee, T. C., Lee, T. H., Huang, Y. H., Chang, N. K., Lin, Y. J., Chang Chien, P. W., . . . Lin, M. H.-C. (2014). Comparison of Surface Markers between Human and Rabbit Mesenchymal stem Cells. *PLOS ONE*, 1-10.
  19. Leeson, T. S., Leeson, C. R., & Paparo, A. A. (1988). *Texto/Atlas de Histología*. Pensilvania USA: Interamericana.
  20. Liu, H.-C., Wang, D.-S., Su, F., Wu, X., Shi, Z.-P., Lv, Y., & Wang, J.-Z. (2011). Reconstruction of Alveolar Bone Defects Using Bone Morphogenetic Protein 2 Mediated Rabbit Pulp Stem Cells Seeded on Nano-Hydroxyapatite Collagen/Poly(L-lactide). *TISSUE ENGINEERING: Part A*, 2417-2433.
  21. Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 216-225.



22. Meling, T., Harboe, K., & Soreide, K. (2009). Incidence of traumatic long-bone fractures requiring in-hospital management: A prospective age- and gender-specific analysis of 4890 fractures. *Injury International Journal*, 1212-1219.
23. Mossman, T. (1989). Specific assay for cytokine production by T cells . *J. Immunol*, 151-158.
24. Nieto Lucio, L., Zamora Cortés, E., Reséndiz Hernández, A., Camacho González, C., Espinosa Hernández, J., Torres BriSeño, R., . . . González Elizarraraz, R. (2012). Consideraciones Epidemiológicas de las fracturas del fémur proximal. *Ortho-tips*, 135-139.
25. O'Brien, J., Wilson, I., & Orton, T. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem*, 5421-5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
26. Page, B., Page, M., & Noel, C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int. J. Oncol*, 473-476.
27. Paulsen, D. F., & Acuña Diaz, H. (1990). *Histología Básica*. México D.F: Manual Moderno.
28. Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P. A. (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Molecular Cell Biology*, 33-45.
29. Sandberg, M., Aro, H., Multimaki, P., Aho, H., & Vuorio, E. (1989). In situ localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus. *J Bone Joint Surg Am*, 69-77.
30. Sfeir, C., Ho, L., Doll, B. A., Azari, K., & Hollinger, J. O. (2005). Fracture Repair. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications.*, 21-44.
31. Shin, M., Yoshimoto, H., & Vacanti, J. P. (2004). In Vivo Bone Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells on a Novel Electrospun Nanofibrous scaffold. *Tissue Engineering*, 33-42.
32. Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., JanSen, J. A., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvaria defect. *Nature*, 19181929.



33. Tan, S. L., Ahmad, T. S., Selvaratnam, L., & Kamarul, T. (2013). Isolation, characterization and the multi-lineage differentiation potential of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Anatomy*, 437-450.
34. Urist, M. S. (1957). The Bone Induction principle. *Clin. Orthop Relat Res*, 243.
35. Urist, M. S. (1967). The Bone Induction principle. *Clin. Orthop Relat Res*, 243-284.
36. Willson, E. B. (1896). *The Cell in Development and Inheritance*. New York: McMillan.