



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**TERAPIA CON CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES
AUTÓLOGAS DE TEJIDO ADIPOSO EN UN DEFECTO MANDIBULAR,
EN UN MODELO DE RATA WISTAR.**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

ROSAURA YUDHO ZÚÑIGA

Directora de Tesis

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Sinodales:

Dr. Alejandro García Muñoz

Biol. José del Carmen Benítez Flores

M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez

M. en C. Francisco Javier Martínez López

Investigación realizada gracias los proyectos: PAPIIT de la UNAM IA201814 y Proyecto CONACYT CB-
2014- 1 235984

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017.





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.

Dedico este trabajo y expreso mi eterno agradecimiento.

Con amor y respeto a papá, mamá, hermanos, tío Bar.

Con admiración a la Dra. Cynthia Trejo líder de un gran equipo de trabajo.

Con cariño a mis compañeros de laboratorio.

*Con gran dicha a Javi y Rocío que han sido mis compañeros, asistentes,
colegas investigadores y, mis amigos.*

Índice

ABREVIATURAS.....	5
1 INTRODUCCIÓN.....	7
2 MARCO TEÓRICO.....	9
2.1.1 Regeneración.....	9
2.1.2 Células troncales.	9
2.1.3 Células troncales mesénquimales.	11
2.1.4 Células Troncales Mesénquimales derivadas de Tejido Adiposo (ADSCs).	16
2.1.5 Biología ósea.	18
3 JUSTIFICACIÓN.....	24
4 ANTECEDENTES	25
5 OBJETIVOS.....	30
5.1 GENERAL.....	30
5.2 PARTICULARES.....	30
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1 Diseño del estudio.....	31
6.2 Extracción de tejido adiposo.	33
6.3 Obtención de las Células Troncales Mesénquimales de Tejido Adiposo (ADSCs).....	34
6.4 Expansión y caracterización celular	35
6.5 Viabilidad y proliferación	37
6.6 Diseño quirúrgico	37
6.7 Implante de Terapia Celular autóloga.....	39
6.8 Evaluación clínica y sacrificio.	40
6.9 Evaluación radiográfica.	40
6.10 Análisis histológico e histomorfométrico de las muestras.	40
6.11 Análisis de los resultados histomorfométricos	41
7 RESULTADOS.	43

7.1	FASE IN VITRO Obtención de la población celular de ADSCs.	43
7.1.1	Cultivo y expansión celular.....	43
7.1.2	Caracterización fenotípica.....	45
7.1.3	Viabilidad y proliferación.	46
7.1.4	Diferenciación osteogénica.	47
7.2	Fase IN VIVO Terapia celular autóloga.....	49
7.2.1	Evaluación clínica de los individuos.	49
7.2.2	Evaluación post mortem.	49
7.2.3	Análisis radiográficos.....	53
7.2.4	Seguimiento de las ADSCs implantadas.	54
7.2.5	Tinción de Hematoxilina – Eosina.	55
7.2.6	Análisis histomorfométrico.	59
8	DISCUSIÓN.....	63
9	CONCLUSIONES	71
10	PERSPECTIVAS	72
11	BIBLIOGRAFIA.....	73
12	ANEXOS.	80

ABREVIATURAS

ADSCs: Células troncales derivadas de tejido adiposo, del inglés *Adipose Derived Stem Cells*.

ASCs: Células troncales derivadas de tejido adulto, del inglés *Adult Stem Cells*.

BM-MSCs: Células troncales mesénquimales de médula ósea, del inglés *Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells*.

BMP: Proteínas morfogenéticas óseas, del inglés *Bone Morphogenic Protein*.

CFU-F: Unidades formadoras de colonias de fibroblastos, del inglés *Colony Forming Unit of Fibroblasts*.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico, del inglés *Epidermal growth factor*.

ESCs: Células troncales embrionarias, del inglés *Embryonic Stem Cells*.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *Fibroblast growth factor*.

ICM: Masa celular interna, del inglés *Inner Cell Mass*

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina, del inglés *Insulin like growth factor*.

IL: Interleucina.

iPS: Células pluripotentes inducidas, por sus siglas en inglés *induced pluripotent stem cells*.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular, del inglés *International Society of Cellular Therapy*.

LPM: Placa lateral mesodérmica, del inglés *Lateral Plate Mesoderm*.

MSCs: Células troncales mesénquimales, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*.

MCP: Proteína quimioatrayente de monocitos, del inglés *Monocyte Chemoattractant Protein*.

OPG: Osteoprotegrina.

PDGF: Factor de crecimiento derivado plaquetario, del inglés *Platelet-derived growth factor*

RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B, del inglés *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*.

RANTES: Regulador sobre la activación normal de la expresión y secreción de células T, del inglés *Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed*.

SVF: Fracción vascular estromal, del inglés *Stromal Vascular Fraction*.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta, del inglés *Transforming growth factor beta*.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumoral Necrosis Factor alpha*.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial, del inglés *Vascular endothelial growth factor*.

1 INTRODUCCIÓN.

Las lesiones maxilofaciales constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes debido a su alta incidencia, entre las principales causas se encuentran: infecciones, tumores, deformidades congénitas, y en la mayoría de los casos los traumatismos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el informe sobre la situación mundial de la seguridad vial de 2015, plantea que 50 millones de personas sufren traumatismos por accidentes de tránsito (OMS, 2015). Estas lesiones en la región maxilofacial requieren una atención especial, ya que además de afectar la estética aquí se controlan varias funciones especializadas que incluyen la visión, respiración, deglución y fonación.

Entre los huesos faciales afectados en este tipo de lesiones se encuentra una alta incidencia de fractura mandibular, 67% según un estudio realizado sobre la incidencia de fracturas maxilofaciales en México (Licéaga *et al.*, 2010).

El hueso es capaz de regenerar lesiones pequeñas a través de los procesos de modelado y remodelado óseo (Raggatt & Partridge, 2010), sin embargo, cuando existe una gran pérdida de tejido, este órgano es incapaz de regenerar, produciendo un tejido cicatricial, fibroso y con abundante matriz extracelular, con propiedades diferentes al tejido original, con un rendimiento alterado de las funciones (Zigdon *et al.*, 2015). Para la reparación de estos daños el estándar de oro es el injerto óseo autólogo, ya que cuenta con tres características importantes: osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis, además, no presenta riesgo de contagio de enfermedades o rechazo inmune; no obstante, éste presenta limitaciones por la necesidad de un sitio donante, y una cirugía secundaria (Nkenke *et al.*, 2002). Por ello, hay una creciente necesidad de encontrar nuevas formas de regenerar y reparar lesiones óseas.

La Medicina Regenerativa es una rama de la Medicina que se fundamenta en los conocimientos sobre las células troncales y su capacidad de diferenciarse a otros linajes, con el objetivo de restablecer la función normal de los tejidos. Esta

disciplina utiliza diferentes herramientas como son: Nanotecnología, Ingeniería Genética, Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular, entre otras (Zigdon *et al.*, 2015).

La Ingeniería de Tejidos y la Terapia Celular han mostrado poseer ventajas terapéuticas sobre el uso de células, materiales y factores de crecimiento, que suministran señales y crean un ambiente necesario para la diferenciación y proliferación celular a fin de conseguir la regeneración en el hueso (Rosset *et al.*, 2014).

2 MARCO TEÓRICO.

2.1.1 Regeneración.

Algunos animales como las planarias, hidras, algunos equinodermos, anfibios, reptiles, entre otros, después de sufrir la pérdida de alguna parte de su cuerpo tienen capacidad de regeneración de la misma (Agata, 2003; Geraudie & Ferretti, 1998; Lozito & Tuan, 2015). En los seres humanos, solamente el hígado tiene la capacidad para regenerar más del 50% de su masa, mediante el mecanismo de regeneración compensatoria (Michalopoulos, 2013).

Después de que un tejido ha sido dañado severamente puede seguir dos vías: la cicatrización o, la regeneración. En la cicatrización existe una excesiva producción de matriz extracelular, dando lugar a un tejido cicatricial que sustituye al tejido original ocasionando la pérdida de la función. Por otro lado, en la regeneración a través de la proliferación, reclutamiento y diferenciación de células troncales se da lugar a la renovación de tejidos, órganos o incluso organismos después de una considerable lesión física o daño resultante de patologías. La regeneración tiene como objetivo final, la recomposición del tejido original y la reanudación de las propiedades biomecánicas y moleculares, desempeñando sus funciones normales (Li & Amaya, 2016).

2.1.2 Células troncales.

Las Células Troncales tienen capacidad de autorrenovación, viabilidad a largo plazo y potencial multilinaje (He *et al.*, 2009), en el organismo, estas células son las principales responsables del mantenimiento de la homeostasis de sus respectivos tejidos sustituyendo células envejecidas o lesionadas (Boiani & Scholer, 2005). Para su estudio, las células troncales se han clasificado de acuerdo a su origen en: Células Troncales Embrionarias (ESCs) y Células troncales derivadas de tejido Adulto (ASCs) (Cuthbert *et al.*, 2015) (Fig. 1).

Las ESCs derivan de la masa interna del blastocisto (ICM), son células pluripotentes con capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo (Boiani & Scholer, 2005) lo que las hace una fuente celular atractiva para la terapia celular, sin embargo, a pesar de su enorme potencial clínico, su uso se encuentra limitado debido a cuestiones éticas, al rechazo alógeno, a su posible capacidad tumorigénica y a su naturaleza teratogénica (Somal *et al.*, 2016). Las ASCs son células troncales multipotentes que se encuentran en tejidos adultos, incluyendo tejidos extraembrionarios. Otro tipo son las células troncales pluripotentes inducidas (iPS) descubiertas recientemente, son células somáticas pluripotentes reprogramadas que por la inducción de los factores de transcripción Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 bajo condiciones de cultivo exhibieron morfología y propiedades de crecimiento de ESCs (Takahashi & Yamanaka, 2006). Estos dos últimos tipos de SCs no representan implicaciones éticas en su uso.

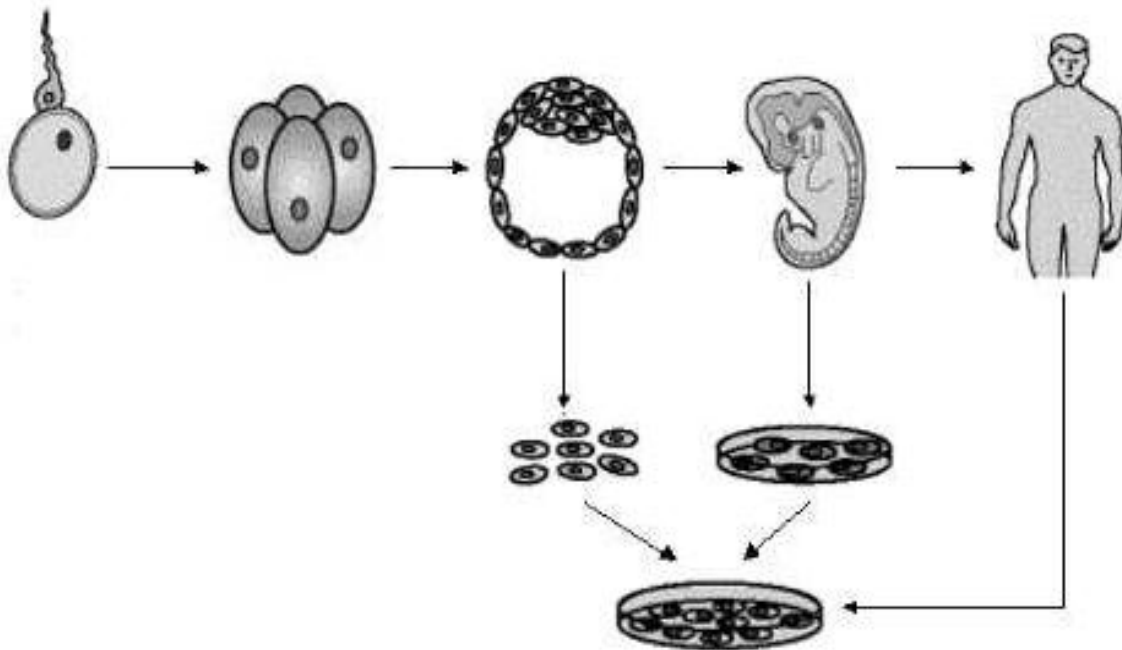


Fig. 1 Clasificación de las células troncales de acuerdo a su origen: Células troncales embrionarias (ESCs) y células troncales derivadas de tejido adulto (ASCs). Imagen obtenida de (Akiyama *et al.*, 2012).

2.1.3 Células troncales mesénquimales.

Las Células Troncales Mesénquimales (MSCs) son ASCs, derivan de la placa lateral mesodérmica (LPM), en específico de la capa somática (Sheng, 2015). Fueron inicialmente descritas en el estroma de la médula ósea por Alexander Friedenstein quien las denominó como Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastos (CFU-F) (Friedenstein *et al.*, 1974), ya que poseen una morfología espigada en forma de huso y núcleo alargado, central, con 2 o 3 nucléolos (Gimble *et al.*, 2007).

2.1.3.1 Caracterización de MSCs.

Desde que fueron descubiertas las MSCs, en el área de la Medicina regenerativa e Ingeniería de tejidos se han realizado numerosas investigaciones utilizando diferentes fuentes de tejidos y métodos de aislamiento, así como de expansión en cultivo, complicando la definición y caracterización de estas células, dificultando así su uso potencial como terapia. Es por ello, que en 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) consensó un conjunto de criterios para la caracterización de las MSCs: 1) adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo, 2) expresión de antígenos de superficie como CD105, CD73 y CD90, así como ausencia de los antígenos CD34 y CD45 en condiciones estándares de cultivo, 3) capacidad de diferenciarse hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico *in vitro*, por un medio específico de inducción (Dominici *et al.*, 2006).

Las MSCs son fácilmente accesibles, muestran altas tasas de proliferación *in vitro*, con bajas tasas de senescencia, además tienen la habilidad de movilizarse hacia áreas de tejidos lesionados *in vivo* (Bajek *et al.*, 2016), y se ha sugerido la expresión de genes clave, marcadores de pluripotencia: OCT4, SOX2 y NANOG (Greco *et al.*, 2007; Riekstina *et al.*, 2009).

2.1.3.2 Marcadores de superficie.

CD 73.

Este marcador es también conocido como: ecto-5'-nucleotidasa, convierte el monofosfato de adenosina extracelular en adenosina. Se ha reportado este marcador como específico para MSCs sin embargo, es también expresado por otros tipos celulares incluidos linfocitos, células endoteliales, células de músculo liso, células epiteliales y fibroblastos (Dominici *et al.*, 2006).

CD 90.

Es también nombrado Thy-1, es una proteína de unión a glicosilfosfatidilinositol que está involucrada en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Su expresión ha sido identificada en células endoteliales, células troncales hematopoyéticas, linfocitos, fibroblastos y neuronas y se ha identificado como marcador de expresión positiva en MSCs (Maleki *et al.*, 2014; Rege & Hagood, 2006).

CD105.

Conocida como endoglina, es una glicoproteína tipo I de membrana que participa como receptor accesorio para los ligandos de la superfamilia TGF- β , su expresión es poco abundante en monocitos, fibroblastos, condrocitos y células troncales hematopoyéticas. Las ADSCs expresan niveles bajos de esta proteína cuando son aisladas, pero su expresión aumenta a medida que aumentan los pasajes en cultivo (Duff *et al.*, 2003; Maleki *et al.*, 2014).

Vimentina.

Marcador específico de células adherentes, marcador del citoesqueleto de las células mesenquimales (Li *et al.*, 2011).

2.1.3.3 Marcadores de potencialidad.

Además de los marcadores de membrana propuestos por la ISCT, se ha descrito en las MSCs la expresión de factores de transcripción que mantienen las células en estado de autorrenovación, lo que les permite un crecimiento rápido y una fase exponencial larga (Somal *et al.*, 2016).

OCT-4.

Es un factor de transcripción crucial durante el desarrollo embrionario, es expresado en ESCs, donde inhibe los genes de tejido-específico permitiendo la autorrenovación y pluripotencia. OCT-4 interactúa con otros factores embrionarios como: SOX2 y NANOG creando una amplia red de regulación para inhibir la diferenciación (Boiani & Scholer, 2005). Se ha evaluado el papel que juega este factor de transcripción en MSCs y se ha descrito que es detectado solamente en los primeros pasajes, observando en pasajes subsecuentes disminución de la expresión y una pérdida de troncalidad lo que sugiere la regulación directa o indirecta para inhibir la diferenciación, regula el ciclo celular, también se ha encontrado que tiene perfiles de genes diana similares a ESCs. Por lo que se cree que interviene en la plasticidad en MSCs (Wang *et al.*, 2012).

2.1.3.4 Potencial multilinaje.

El potencial multilinaje es la habilidad que presentan las MSCs de diferenciarse *in vitro* a los linajes de la misma capa germinal: el linaje condrogénico, adipogénico y osteogénico, entre otros, lo que las hace atractivas para su uso potencial en la Terapia celular (Caplan, 2005) (Fig.2). No obstante debido a su plasticidad clonogénica (Wagers & Weissman, 2004) también se ha comprobado que pueden diferenciarse a linajes de las otras capas germinales; endotelio (Miranville *et al.*, 2004), tejido nervioso (Ashjian *et al.*, 2003), hepatocitos (El-Kehdy *et al.*, 2016),

cardiomiocitos (Nagata *et al.*, 2016), células epiteliales (Brzoska *et al.*, 2005), entre otros.

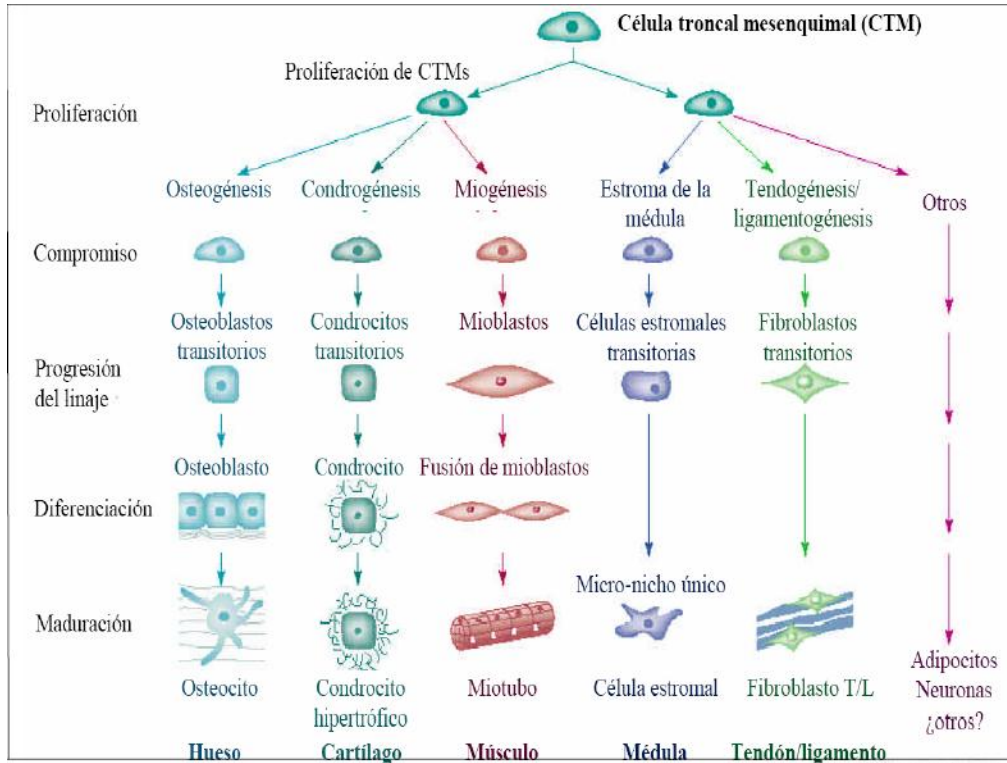


Fig. 2. Diferenciación de las MSCs a linajes mesodérmicos. Obtenida de Caplan, 2005.

2.1.3.5 Fuentes de obtención.

Se han estudiado ampliamente las MSCs derivadas de la medula ósea (BM-MSCs), se ha reportado que su rendimiento promedio es de 0.001%-0.01% en 6×10^6 células nucleadas por mililitro de aspirado (Fraser *et al.*, 2006; Guneta *et al.*, 2016); sin embargo, existe una amplia brecha entre el número de MSCs obtenidas y el número de éstas que se necesitan para su aplicación en la terapia celular. No obstante, las MSCs además de encontrarse en la medula ósea, tienen su nicho en varios tejidos (da Silva *et al.*, 2006) principalmente en el tejido conectivo en órganos de origen mesodérmico (Colnot, 2011).

Existen numerosas fuentes de obtención incluyendo pulpa dental, ligamento periodontal (Akiyama *et al.*, 2012), tejido epitelial (Slack, 2000), pulmón, hígado, músculo (da Silva *et al.*, 2006), tejido adiposo (Zuk *et al.*, 2001). Adicionalmente, se han aislado poblaciones de MSCs en tejidos gestacionales como: cordón umbilical, placenta y gelatina de Wharton (Gu *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2013; Stubbendorff *et al.*, 2013).

2.1.3.6 Mecanismo de acción de las MSCs

Se ha propuesto el efecto parácrino como mecanismo de acción de las MSCs en la reparación de lesiones. Las MSCs actúan secretando moléculas activas causando un gran número de respuestas celulares como: supervivencia, proliferación, migración y expresión génica (Meirelles *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014). Estudios han demostrado la presencia de 43 factores angiogénicos en un medio condicionado (CM) de ADSCs, entre los que se incluyen citosinas, factores de crecimiento, proteasas y factores solubles. De éstos se han reportado 11 presentes en MSCs, entre los que se encuentran; Interleucina 6 (IL-6), Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), angiogenina, angionina, proteína quimioatrayente de monocitos 3 (MCP-3), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento derivado plaquetario (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial (EGF) y regulador sobre la activación normal de la expresión y secreción de células T (RANTES) implicados en el proceso de regeneración ósea, ya que estas citosinas regulan varios eventos de osteogénesis, angiogénesis, migración celular, proliferación y diferenciación (Ando *et al.*, 2014; Linero & Chaparro, 2014).

Además de los factores de crecimiento las MSC secretan otras moléculas bioactivas como: citocinas y quimiocinas para alcanzar su efecto terapéutico:

moléculas antiapoptóticas, inmunomoduladoras, anticicatrizantes, de soporte, angiogénicas y quimioatrayentes (Meirelles *et al.*, 2009) (fig. 3).

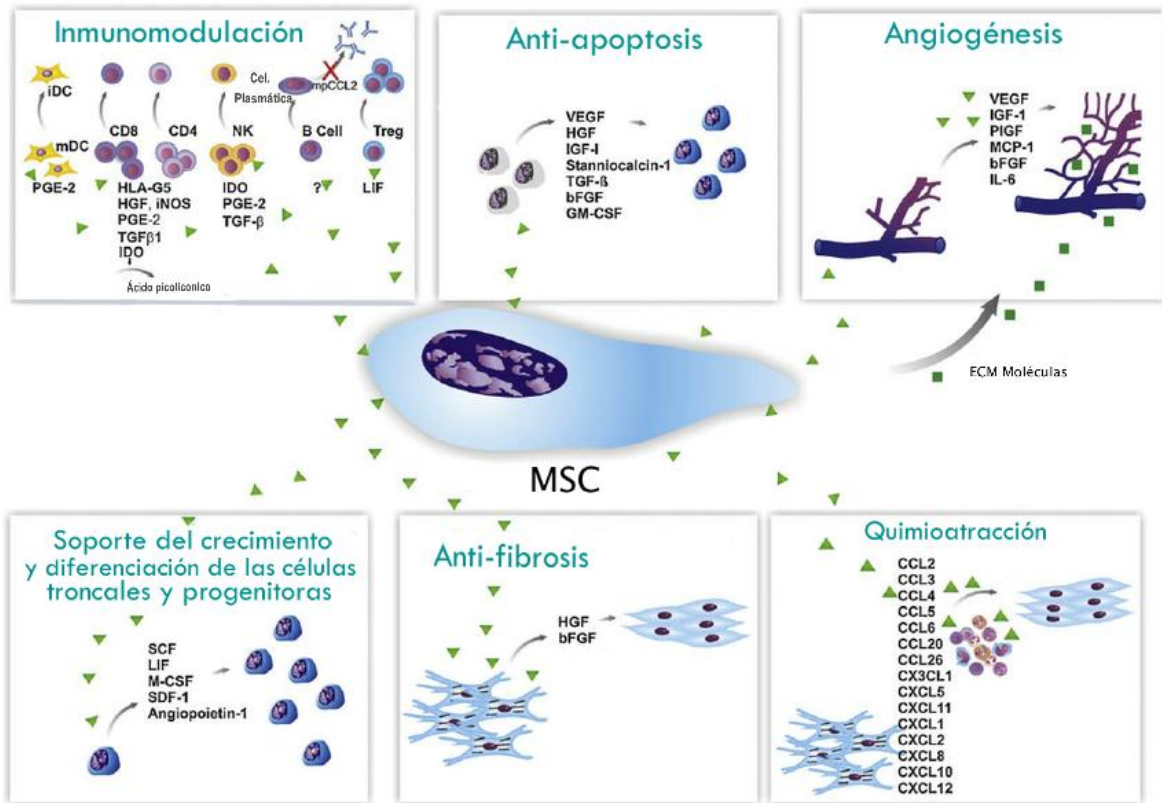


Fig. 3 Secreción de moléculas bioactivas por las MSCs in vitro, afirman la idea del efecto parácrino como mecanismo de acción para la reparación de lesiones Obtenida y modificada de Meirelles *et al.*, 2009.

2.1.4 Células Troncales Mesénquimales derivadas de Tejido Adiposo (ADSCs).

En el organismo el tejido adiposo se clasifica en pardo o plurilocular presente sólo en recién nacidos y tiene como función la termorregulación, por otro lado está el tejido adiposo blanco o unilocular que es la principal reserva de energía (en forma de triglicéridos), y participa como secretor (leptina, adiponectina y proteína lipasa),

se encuentra distribuido en todo el cuerpo, principalmente en el abdomen (Sheng, 2015; Sobotta, 2009).

El tejido adiposo, al igual que la médula ósea, es derivado del mesodermo embrionario y contiene una fracción estromal fácilmente aislable (Cinti, 2001; Zuk *et al.*, 2001): Se identificó una población de células troncales en el tejido adiposo humano considerando así, a este tejido como fuente ideal ya que, se puede obtener de forma relativamente fácil un gran número de células en cultivo (*Meza et al.*, 2002; *Zuk et al.*, 2002a), se ha comprobado que de 1g de tejido adiposo se puede obtener un rendimiento aproximado de 5×10^3 células. Además, a diferencia de la médula ósea se trata de un tejido que puede ser extraído a través de un procedimiento mínimamente invasivo y se pueden obtener varios gramos del mismo en una cirugía. Por lo que la utilización de tejido adiposo como fuente de MSCs puede ser un recurso valioso para la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa (El-Kehdy *et al.*, 2016; Fraser *et al.*, 2006).

2.1.4.1 Fracción vascular estromal.

En la práctica clínica a menudo no se administran ADSCs puras, más bien se aplican como parte de la fracción vascular del estroma (SVF) que es un componente de la mezcla de tejido adiposo, tejido estromal y sangre. La SVF contiene una variedad de células tales como: células troncales (<0.1%), monocitos (10-15%), granulocitos (5-15%), linfocitos (10-15%), pericitos (10-20%), progenitores vasculares endoteliales (10-20%), células estromales (15-30%), preadipocitos, fibroblastos, células de musculo liso, además de células sanguíneas (Bliley *et al.*, 2015; Zimmerlin *et al.*, 2010).

2.1.5 Biología ósea.

El hueso es un tejido conectivo especializado que se caracteriza por poseer matriz orgánica mineralizada, es el principal componente del esqueleto adulto. Tiene importantes funciones para el organismo: provisión de integridad mecánica para la locomoción, lugar de inserción de músculos, protección mecánica al cerebro, médula espinal, órganos del tórax y abdomen, es lugar donde se lleva a cabo la hematopoyesis, además juega un papel importante en las vías metabólicas asociadas a la homeostasis mineral como reservorio de iones Ca, P, K (Michael & Wojciech, 2009; Sobotta, 2009).

2.1.5.1 Histología ósea.

- Matriz.

Está formada por un componente inorgánico constituido principalmente por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y un componente orgánico constituido por células y proteínas; principalmente colágenas como el colágeno tipo I, También contiene proteínas no colágenas que forman la sustancia fundamental. En la matriz se encuentran las lagunas u osteoblastos que contienen los osteocitos. (Junqueira & Carneiro, 2006; Michael & Wojciech, 2013; Sobotta, 2009).

- Células osteoprogenitoras.

Son MSCs que dan origen a las células de la línea ósea.

- Osteoblastos.

Son células cuboidales de aproximadamente $10\mu\text{m}$ de diámetro, sintetizan la parte orgánica: colágeno tipo I, proteínas de la matriz ósea y factores de crecimiento que constituyen el tejido osteoide. Se disponen en la superficie ósea y cuando

finalizan la síntesis de matriz se aplanan y se convierten en células de revestimiento o en osteocitos (sólo de 10-20%) cuando se quedan dentro de la matriz recién sintetizada.

- Osteocitos.

Son células óseas maduras más pequeñas que los osteoblastos, que permanecen dentro de la matriz ósea ocupando las lagunas osteocíticas, a partir de las cuales se originan los canalículos, que permiten la comunicación entre ellas. Estas células son fundamentales para el mantenimiento de la matriz ósea.

- Osteoclastos.

Son Células multinucleadas gigantes de origen hematopoyético, miden aproximadamente 100µm, su función principal es la resorción ósea mediante la liberación de enzimas líticas para la reducción del pH en el sitio de resorción. Están presentes cuando el hueso está lesionado o se está remodelando.

2.1.5.2 Factores de crecimiento.

Son moléculas que actúan a nivel de la membrana celular a través de receptores específicos. Sus funciones en el tejido óseo son: la proliferación, migración y diferenciación de MSCs, la quimiotaxis, la proliferación y diferenciación de osteoblastos, la producción de colágeno y favorece la angiogénesis. Algunos aumentan la proliferación de fibroblastos, supervivencia y diferenciación de células endoteliales e inhiben la producción de osteoclastos (Estrada & Uribe, 2002).

Algunos de los Factores de crecimiento más importantes en el tejido óseo son: Factor de crecimiento transformante (TGF-β), derivado plaquetario (PDGF), de fibroblastos (FGF), similar a la insulina (IGF), vascular endotelial (VEGF), epidérmico (EGF) y Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Gómez & Campos, 2009).

2.1.5.3 Organización estructural.

El tejido óseo, para su estudio, se clasifica en dos tipos:

1) Hueso trabecular o esponjoso.

Constituye el 20% del total de los huesos y está compuesto por finas hojas o trabéculas que se entrecruzan con los túbulos formando un entramado de distribución irregular dejando huecos en donde alberga a la médula ósea y vasos sanguíneos, este hueso es el principal integrante de la epífisis de huesos largos y del interior de la mayor parte de huesos cortos y planos.

2) Hueso cortical o compacto.

Constituye el 80% total de los huesos y da protección y soporte, integra la mayor parte de las diáfisis de huesos largos y la parte externa de todos los huesos del cuerpo, forma una masa compacta cuatro veces más que el hueso esponjoso, está constituido en su mayor parte por matriz ósea formando láminas que envuelven a un conjunto de canales denominados osteonas o sistema de Havers que consisten en láminas concéntricas de matriz ósea rodeando un conducto central (conducto de Havers), conectados por los canales de Volkman. A través de ambos canales se extienden vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Estrada & Uribe, 2002; Sobotta, 2009).

2.1.5.4 Embriología ósea.

El hueso en su formación puede tomar dos vías: la osificación endocondral y la osificación intramembranosa (Estrada & Uribe, 2002; Michael & Wojciech, 2013; Sobotta, 2009).

∴ Osificación endocondral.

Este tipo de osificación es característica en huesos de las extremidades, vértebras y cinturón óseo pectoral y pélvico. Se inicia sobre una placa de cartílago hialino, ocurre hipertrofia de los condrocitos, reducción de la matriz cartilaginosa, mineralización y muerte de los condrocitos que dejan cavidades que son infiltradas por capilares sanguíneos y células osteogénicas que se diferencian en osteoblastos productores de matriz.

∴ Osificación intramembranosa.

En los huesos de la bóveda craneal, íleon, escápula, clavícula y en los huesos maxilares. Tiene lugar en las capas de tejido conjuntivo y se inicia en la zona denominada centro de osificación primario, ocurre la diferenciación de células mesenquimatosas en osteoblastos que sintetizan el osteoide, éste al ser mineralizado engloba osteoblastos que se transforman en osteocitos.

2.1.5.5 Remodelado óseo.

El hueso es un órgano activo en constante adaptación, al crecimiento, a la tensión mecánica y para reparar lesiones pequeñas. Esto es llevado a cabo a través de los procesos de modelado y remodelado. El modelado óseo se encarga del crecimiento y la adaptación mecánica, mientras que el remodelado es el responsable de la reparación del daño para mantener la integridad y homeostasis del tejido (Raggatt & Partridge, 2010). El remodelado óseo es realizado por osteoclastos que reabsorben hueso y osteoblastos que forman el mismo, se encuentran arreglados en estructuras anatómicas temporales conocidas como unidades multicelulares básicas (BMU), este proceso ocurre en varias fases: que se mencionan a continuación (Raggatt & Partridge, 2010; Rucci, 2008) (Fig. 4).

≡ Activación.

A través de la detección de una señal iniciadora, puede ser un daño en el hueso resultando en la apoptosis de osteocitos que lleva a la disminución local de TGF-β

promoviendo así la osteoclastogénesis. O bien puede tratarse de una señal endócrina como la paratohormona (PTH) que induce una serie de respuestas que modulan la secreción de moléculas para el reclutamiento de precursores de osteoclastos y la diferenciación y activación de los mismos.

≡ Resorción.

En respuesta a la PTH los osteoblastos liberan la quimiocina MCP-1 quimioatrayente de osteoclastos y expresan las citocinas CSF-1 y RANKL que promueven la formación de los osteoclastos y su actividad. Los osteoclastos maduros se anclan a sitios de unión RGD y crean un microambiente.

≡ Reversa.

Después de la resorción, en esta fase células reversas de fenotipo desconocido, remueven matriz desmineralizada de la superficie ósea. Se generan señales de transición que indican que el proceso de resorción ha terminado y estimulan el proceso de formación ósea.

≡ Formación.

Las señales de formación son producidas por la matriz degradada, de los osteoclastos maduros y de las células reversas. La PTH y la activación mecánica de osteocitos reducen la expresión de la esclerostina, permitiendo que ocurra la formación ósea.

≡ Terminación.

Es la fase de conclusión del ciclo y ocurre cuando se ha reemplazado la misma cantidad de hueso reabsorbido.

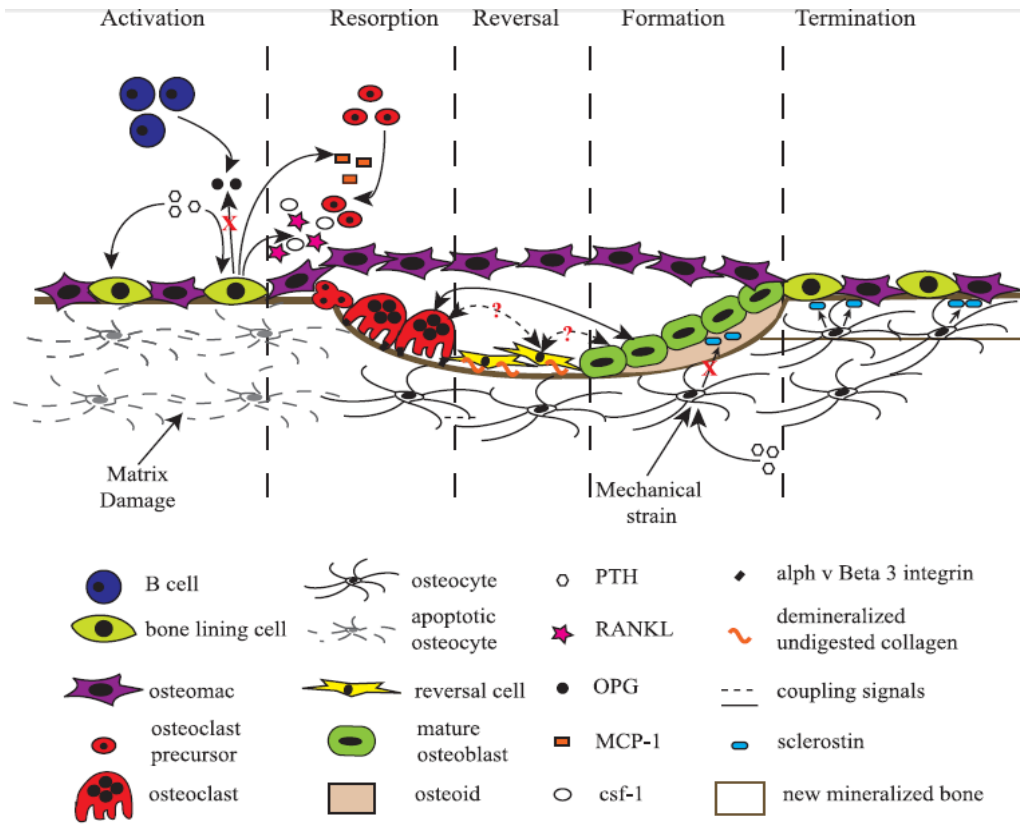


Fig. 4 Representación del proceso de remodelado óseo Obtenido de Raggatt & Partridge, 2010.

3 JUSTIFICACIÓN

Las fracturas, así como los defectos óseos, representan un reto terapéutico por los periodos de tratamiento que pueden ser largos y complicados, con el uso de clavos intramedulares, tornillos y fijadores externos, que además de los costos económicos altos, no promueven la regeneración (Kumar et al., 2016). Para conseguir la regeneración ósea, el estándar de oro sigue siendo el hueso autólogo ya que presenta las propiedades de osteoconducción, osteogénesis y osteoinducción (Nkenke *et al.*, 2002) sin embargo, esta técnica tiene limitaciones relacionadas a la necesidad de un sitio donante, la recolección del hueso que implica una cirugía secundaria y la morbilidad que esto ocasiona. Por lo que es importante realizar estudios con nuevos tratamientos que nos permitan, disminuir el tiempo de recuperación, abaratar los costos y dar recuperación óptima a los pacientes.

La Ingeniería de Tejidos con el uso de biomateriales ha sido ampliamente estudiada debido a que éstos juegan un papel importante en la formación de constructos (Zigdon *et al.*, 2015), no obstante, las fuentes celulares son la llave de la regeneración por ello se buscan alternativas como la Terapia celular.

Realizar el defecto mandibular tal como lo diseñamos en nuestro modelo de estudio, nos permite observar la capacidad de regeneración en la zona cortical mandibular, que como lo hemos mencionado anteriormente, es un tipo de hueso poco vascularizado y con una regeneración pobre.

4 ANTECEDENTES

La creciente necesidad de encontrar alternativas de tratamiento para lograr la regeneración ósea, aminorando tiempos y costos ha llevado al avance del conocimiento científico en el área de la Medicina Regenerativa. Los investigadores en Ingeniería de Tejidos y terapia celular han realizado diversos estudios evaluando biomateriales, moléculas y fuentes celulares en diferentes modelos de estudio.

En referencia al empleo de MSCs como herramienta en la mejora de la regeneración y seguridad de utilización, realizaron un estudio experimental sobre la seguridad de la aplicación de ADSCs: 1) Evaluación de toxicidad administrando por vía intravenosa las células, en 160 ratones SCID (80 hembras y 80 machos) a; dosis baja 5×10^6 cel/kg; media 3.5×10^7 cel/kg; y alta 2.5×10^8 cel/kg, analizando signos vitales, apariencia, presencia o alguna respuesta anormal durante 13 semanas. 2) Evaluación de tumorigenicidad, administrando por vía subcutánea las células en 116 ratones atímicos (58 machos y 58 hembras) que fueron divididos en grupos de dosis baja 2×10^6 cel/kg; media 2×10^7 cel/kg; alta 2×10^8 cel/kg, comparando la formación de tumor negativa con células MRC-5 de pulmón fetal humano, y positiva con células A375 de melanoma maligno humano; durante 26 semanas. 3) Evaluación clínica humana en 8 hombres con lesión de médula espinal (SCI) de grado A o B en la escala ASIA de discapacidad (cuadripléjicos y parapléjicos) a los que les administraron 4×10^8 hAdMSCs autólogas por la vena cefálica y se evaluaron a: 1, 4, 7 días; y 4 y 12 semanas. Obtuvieron como resultados en la 1) evaluación de toxicidad que no hubo cambios en el peso y el consumo de alimento entre los grupos, aumentó en la ingesta de agua en el grupo de dosis media a las tres semanas y aumentó en todos los grupos a las 7 semanas, y en el análisis histopatológico no hubo hallazgos anormales. 2) En la evaluación de tumorigenicidad, todos los ratones del control positivo desarrollaron tumores, pero estos no fueron desarrollados en alguno de los otros grupos. Finalmente 3) En la evaluación clínica humana para lesión de médula espinal

(SCI), no hubo diferencias significativas en el electrocardiograma, examinación física y signos vitales antes y después de las 12 semanas de tratamiento, además las áreas de daño en la espina dorsal disminuyeron, aunque no hubo diferencias significativas. Por todo lo anterior, concluyeron que las hAdMSCs no provocan efecto de toxicidad y no inducen el desarrollo de tumores en ninguna de las dosis incluso en su dosis más alta. Sobre la base de sus resultados proponen que las hAdMSCs se pueden administrar de manera segura por vía intravenosa de infusión lenta y pueden ser utilizadas para fines terapéuticos (Ra *et al.*, 2011).

Aunado a esto, numerosos autores han evaluado la capacidad de regeneración osteogénica de estas células en diferentes modelos de defectos óseos y en diferentes especies, entre ellos:

En un modelo de defecto crítico de calota en ratones FVB, analizaron la capacidad osteogénica *in vivo* de ADSCs comparadas con células estromales de médula ósea (BMS), osteoblastos derivados de calota y células de la duramadre. Realizaron defectos de 0.8, 2, 3, 4 y 5 mm de diámetro en el hueso parietal, evaluando resultados a 2, 4, 8 y 12 semanas. A las 12 semanas de tratamiento observaron un incremento en la formación ósea en todos los grupos, mostrando un relleno de la cavidad del 70 al 90%, excepto en el grupo control. A cada tiempo de estudio la formación ósea fue histológicamente similar entre los grupos tratados con ADAS y con BMS, después de las 12 semanas el nuevo hueso formado fue consistente al 92% de las células implantadas. Concluyeron que la formación ósea fue debida a la contribución de las ADAS y que éstas son capaces de reparar defectos críticos por lo que pueden ser utilizadas en la Medicina regenerativa (Cowan *et al.*, 2004).

En otro modelo llevado a cabo en defectos no críticos en fémur de ratón, evaluaron la capacidad regenerativa y osteoinductiva de las hASC con BMP-2; emplearon 50 ratas divididas en 5 grupos (n=10): Control; Fibrina (F); Fibrina + ASC; Fibrina + ASC + BMP-2; Fibrina + BMP-2. Después de 2 y 4 semanas, concluyeron por medio de histología y microCT que la combinación de las ASC y BMP-2 en una matriz de fibrina después de 2 semanas reduce significativamente

la formación de callo óseo en comparación a cuando se emplea la BMP-2 sola, ya que ésta solo aumentó significativamente el callo de reparación. Por otro lado, argumentan que las ASC empleadas solo con fibrina en su modelo animal, no dio lugar a un aumento en la regeneración. Afirmando entonces, que las células ASC mejoran la reacción osteoinductiva de la BMP-2 (Keibl et al., 2011).

En un modelo de ovino evaluaron la capacidad de regeneración ósea de ASC autólogas en un defecto crítico en la tibia; para ello realizaron cuatro grupos de estudio. 1) ASCs autólogas en colágeno mineralizado, 2) BMSCs autólogas en colágeno mineralizado; 3) ASCs autólogas en colágeno mineralizado adicionadas con plasma rico en plaquetas (PRP), y 4) grupo control (sin células). En sus resultados radiográficos e histológicos los grupos tratados con BMSCs y con PRP, exhibieron unión del defecto y una cantidad significativamente mayor de hueso comparado con el grupo de ASCs y con el grupo control; por lo que los autores concluyeron que las ASCs tiene una capacidad inferior de formación ósea en comparación a cuando emplearon las BMSCs en su modelo. No obstante, demostraron la capacidad de regeneración que tienen las ASCs cuando se emplean con el PRP como coadyuvante, por lo que se siguen considerando a estas células como una fuente atractiva para su uso clínico (Niemeyer et al., 2010).

Evaluaron la capacidad de regeneración de ADSC humanas en el tratamiento de defectos óseos de 5 mm en la rama mandibular, realizados en ratas atímicas. Para ello, emplearon los siguientes grupos: Grupo 1 (n=10): defecto protegido con una membrana reabsorbible comercial (PBH, Protected bone healing) y en el lado contralateral realizaron el defecto vacío; Grupo 2 (n=10): defecto tratado con hueso autólogo y en el lado contralateral realizaron el defecto vacío; Grupo 3 (n=10): hADSC y en el lado contralateral colocaron solo la PBH; los tiempos que estudiaron fueron: 0, 1, 2, 4, y 8 semanas. Realizaron análisis histológico y de tomografía volumétrica computarizada de panel plano (fpvCT). Concluyeron que las ADSC humanas indiferenciadas son capaces de regenerar defectos críticos

mandibulares y proponen que su efecto es comparable con el injerto óseo autólogo (Streckbein et al., 2013).

Para monitorear la actividad de las ASCs implantadas autores han marcado las células: Con la proteína fluorescente verde GFP para reparar defectos críticos de 4mm realizados en el parietal en ratones machos desnudos. Realizaron tres grupos de estudio: 1) control con defecto sin tratamiento; 2) andamio de PLGA y apatita; 3) ASCs en el andamio de PLGA y apatita. Realizaron MicroCT a 1, 2, 3, 4 y 8 semanas e Histología, hibridación in situ e histomorfometría después de 8 semanas. En sus resultados determinaron que a las dos semanas las ASCs se encontraban en el defecto y determinaron por hibridación in situ que éstas no se quedan en el defecto más de dos semanas. Posteriormente realizaron un nuevo experimento con cuatro grupos (n=3), 1): andamio solo; 2) andamio+BMP2, 3): andamio+ASCs y 4): andamio+BMP2+ASCs, en los que después de 8 semanas observaron que las ASCs implantadas mostraron una diferenciación al linaje osteogénico determinado por qRT-PCR y su expresión histológica a través del marcaje fluorescente GFP, así como una regeneración del defecto en más de 55%. Concluyendo así, que las ASCs humanas sin pueden ser usadas en el tratamiento de defectos en humanos. Y que la BMP2 puede actuar adecuadamente, modulando la capacidad de regeneración ósea de las ASC (Levi et al., 2010).

También hASCs fueron transfectadas con un lentivirus con los genes de luciferasa (Fluc) y proteína fluorescente roja (RFP), y ASCs de ratones CD-1 que expresan el transgen Luciferasa (Luc+mASC), en un modelo de ratón al que le realizaron un defecto de 4mm en calota. Los grupos de estudio fueron: Grupo 1 Sham (n=5): ratones sin defecto, se les realizó una incisión en la piel; Grupo 2 (n=5): ratones con un defecto, tratados con hASC o Luc+mASC inyectadas por vía intravenosa (200,000 células en 200µl de solución salina); Grupo 3 control (n=5): células aplicadas directamente en un andamio de PGAL. Se evaluaron por histología y microCT a 4 semanas de tratamiento. Como resultados detectaron la actividad de la luciferasa en la zona de defecto hasta la 4° semana, además, las hASC

incrementaron la osificación del defecto no así las mASC; por lo que concluyeron que la aplicación de la terapia por vía IV es segura, que las células viajaron y se mantuvieron en el sitio de lesión y que las hASC contribuyeron a la reparación del defecto de calota (Levi et al., 2011).

Por otro lado autores han evaluado la terapia con ADSCs indiferenciadas y un medio condicionado (CM) en defectos mandibulares en conejos. El CM lo elaboraron recolectando el medio de cultivo en el que estaban sembradas las células ADSCs en condiciones de hipoxia (2% O₂) entre el 6 y el 7 pasaje. Realizaron 3 grupos: 1 (n=4): HBPHs (*Human Blood Plasma Hydrogels*) con ADSC en un lado y en el lado contrario aplicaron HBPHs solo, a tiempos de estudio de 15, 30 y 45 días. En el Grupo 2 (n=4): aplicaron HBPHs con Ad-MSA en ambos lados a 3, 6, 9 y 12 días. En el Grupo 3 (n=3) = aplicaron CM1 (100ug/ml) en un lado y CM2 (200ug/ml) en el otro lado a 45 días. Después de realizar análisis morfológicos, radiográficos e histológicos, concluyeron que las ADSCs mejoran el proceso de regeneración ósea, y que la calidad y cantidad de hueso regenerado es similar cuando se aplican los factores parácrinos en forma de CM en lugar de las células (Linero & Chaparro, 2014).

Estos estudios revelan que el empleo de las ADSCs es seguro, no presentan efectos tóxicos ni tumorigénicos. Pero que dependiendo del tipo de modelo empleado varía la capacidad osteogénica; por ello, nosotros nos hemos propuesto evaluar la capacidad de regeneración ósea de estas células cuando son empleadas en un defecto mandibular realizado en la cortical mandibular de ratas Wistar, que es un área del hueso que presenta poca vascularización y con ello menor reparación y regeneración por sí misma. Basándonos en un modelo de defecto crítico que ya ha sido presentado previamente (Ramírez, 2015; Trejo, 2010)

5 OBJETIVOS.

5.1 GENERAL.

- Evaluar el proceso de regeneración ósea en un defecto mandibular en rata, tratado con células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC).

5.2 PARTICULARES.

- Obtención y caracterización de una población de ADSCs de rata Wistar.
- Cultivo y expansión *in vitro* de las ADSCs para su uso terapéutico.
- Análisis clínico e histológico de la respuesta a la Terapia Celular autóloga en el defecto crítico mandibular.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio cuenta con el aval del comité de bioética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM con el número de folio 1074; el cuidado y uso de animales de laboratorio se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana “NOM-062-ZOO-1999”; los desechos orgánicos se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana “NOM-087-ECOL-SSA12002”; el manejo de residuos se realizó de acuerdo a la “Guía técnica” de la comisión de bioseguridad de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM bajo el aval del número de folio 36.

6.1 Diseño del estudio.

Se emplearon un total de 66 ratas Wistar macho que pesaron entre 200–250g., que fueron divididos: grupo Control (Ct) (n=36), grupo Experimental de terapia celular autóloga (ADSCs) (n=30) (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño del estudio: Grupos y repeticiones.

Grupo de estudio	Tiempo de estudio	Número de animales
Experimental – defecto con ADSCs	7, 14, 21, 30 y 60 días	6 por tiempo de estudio
Control – defecto sin tratamiento	7, 14, 21, 30 y 60 días	6 por tiempo de estudio
Defecto	Tiempo 0	6

Se utilizaron 36 individuos para el grupo control negativo, se les realizó un defecto quirúrgico en la cortical mandibular, siguiendo el protocolo de Ramírez en 2015,

Los especímenes se dividieron en 6 subgrupos (n=6) que fueron sacrificados a los 0, 7, 14, 21, 30 y 60 días respectivamente después de la cirugía.

Se utilizaron 30 individuos para el grupo experimental. A los que se les realizó el defecto quirúrgico como se indicó anteriormente y se les aplicaron ADSCs autólogas como terapia celular. Los especímenes se dividieron en 5 subgrupos (n=6) que fueron sacrificados a los 7, 14, 21, 30 y 60 días respectivamente después de la cirugía.

Los especímenes se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) con una temperatura de entre 21-27°C, una humedad relativa de 45–55% y en un fotoperiodo de 12/12 horas con acceso *ad libitum* al agua y alimento. Todas las intervenciones se realizaron en el Bioterio de la FESC, en condiciones de asepsia, en una sala de cirugía limpia y se utilizaron campos y material quirúrgico estériles (fig.5).



fig. 5 Área de cirugía en condiciones de asepsia y material estéril.

6.2 Extracción de tejido adiposo.

Para la extracción del tejido adiposo subcutáneo los animales fueron pesados con una balanza granataria y anestesiados con una inyección intraperitoneal de anestésico general ANESKET® (Clorhidrato de Ketamina, 60mg/kg de peso) y un relajante muscular PROCIN® (Xilazina, 7mg/kg de peso). El área quirúrgica fue rasurada y desinfectada con benzal (solución antiséptica) y con un bisturí se realizó una incisión de una sola intención de 2cm en la zona ventral. Se utilizaron pinzas tipo mosco para realizar la disección roma y llegar a la zona inguinal, se separó el tejido adiposo de la piel y se tomaron muestras de aproximadamente 3g (Fig. 6). El tejido se colocó en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with L-Glutamine) con antibiótico para su transporte y para su procesamiento inmediato.

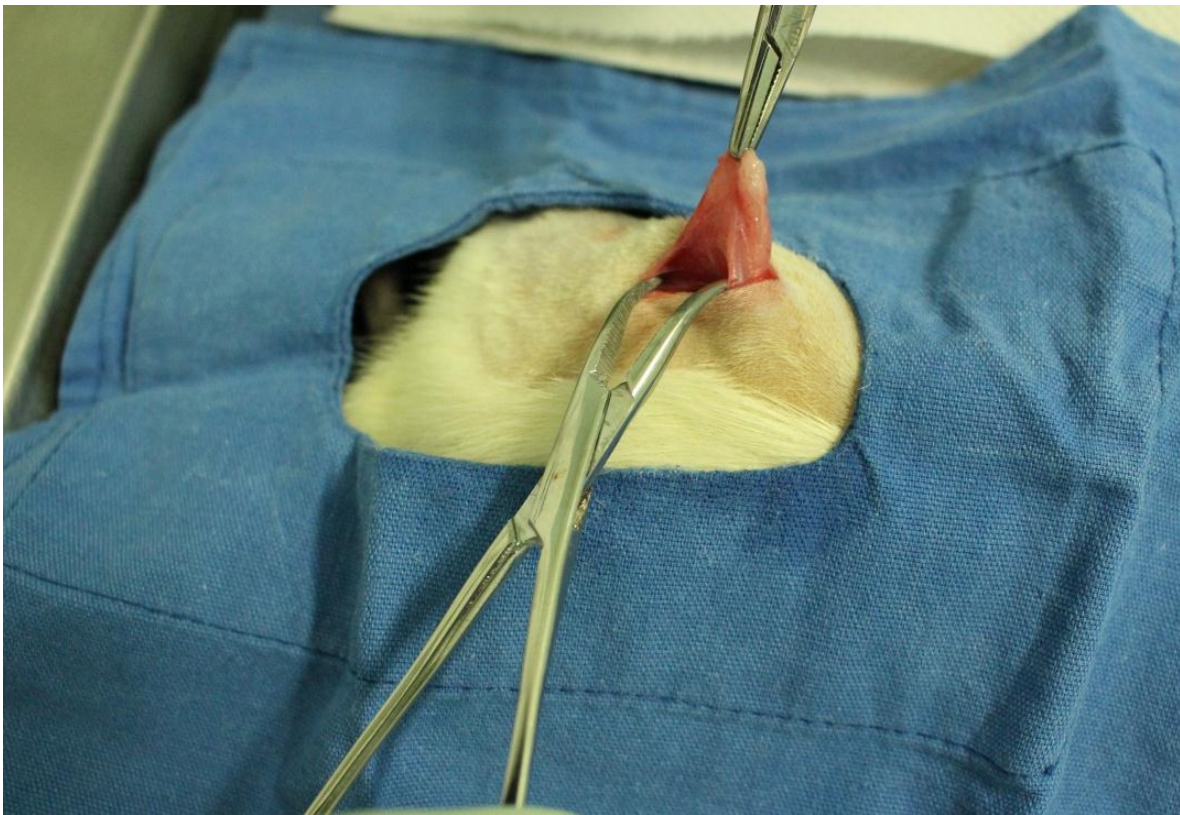


Fig. 6. Procedimiento quirúrgico: extracción del tejido adiposo subcutáneo

Se suturó la herida utilizando la técnica de puntos separados con suturas de seda 3-0 estériles. Para evitar infecciones las ratas fueron medicadas con antibiótico Pentrexil® (Ampicilina, 10mg/kg de peso, cada 24 horas durante 3 días), y con el objetivo de minimizar las molestias al máximo en los especímenes y siguiendo el reglamento interno para el cuidado y uso de los animales de experimentación en investigación y docencia en la Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán UNAM fueron tratadas con analgésico Pisadol® (tramadol 5mg/kg de peso cada 24 horas, durante 3 días posteriores a la cirugía), mantenidas y monitoreadas hasta el posterior procedimiento.

6.3 Obtención de las Células Troncales Mesénquimales de Tejido Adiposo (ADSCs).

Dentro del cuarto de cultivos del Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz (LIO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) se realizó la extracción de las ADSCs en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

Se realizaron 3 lavados del tejido con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) para retirar restos de sangre y pelos, y fue cortado hasta obtener fragmentos de aproximadamente 2mm de diámetro, con el objetivo de facilitar la digestión enzimática, que se realizó mediante colagenasa tipo I al 0.01% a 37°C y en agitación manual cada 5 minutos, durante 40 minutos. Pasado este tiempo el tejido fue filtrado por una malla de nylon de 100µm de poro para separar la matriz que no fue digerida y la solución obtenida se centrifugó a 1400rpm durante 6 minutos. Al momento de centrifugar se obtuvieron 3 capas (Fig. 7):

- Capa aceitosa o de tejido adiposo.
- Capa acuosa
- Botón celular (que contiene la SVF).

El botón celular fue resuspendido en DMEM y centrifugado nuevamente a 1400rpm/6min, se desechó el sobrenadante y se colectó el botón.

La fracción celular obtenida se mantuvo en condiciones estándares de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de FBS (Fetal Bovine Medium) y 1% Antibiótico y antimicótico, incubadas a 37°C/5%CO₂, después de 24h se observó el cultivo en el microscopio invertido, las células no adherentes fueron removidas y el cultivo lavado con PBS 1X y fueron mantenidas realizando cambios de medio cada 48h, hasta alcanzar confluencia del 80%.

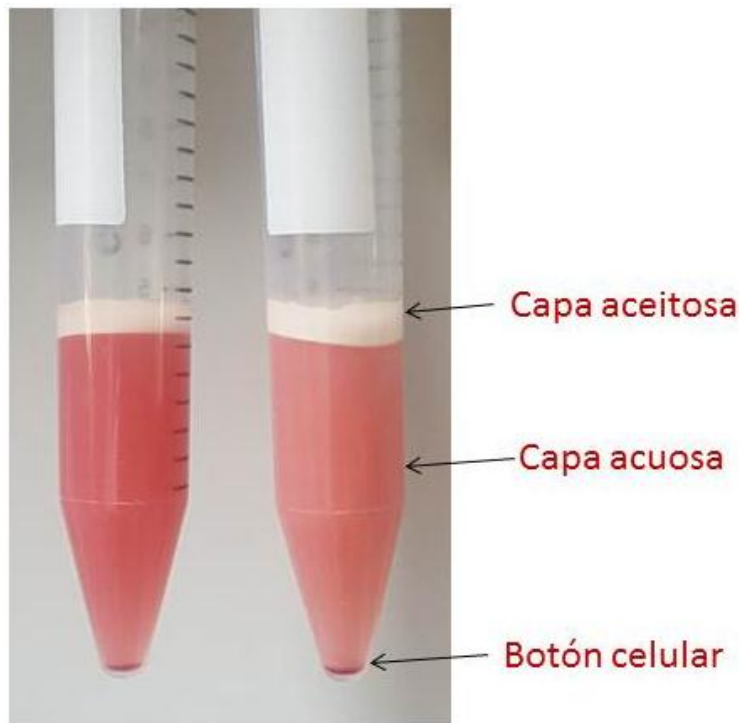


Fig. 7. Tejido adiposo subcutáneo procesado con colagenasa tipo I. después de centrifugar se observan las capas (de arriba hacia abajo): aceitosa, acuosa y el botón celular (FVS).

6.4 Expansión y caracterización celular

- Caracterización morfológica

Para analizar las características morfológicas de la población celular obtenida, se tomaron en cuenta las células adherentes a la superficie de cultivo, se realizaron observaciones y registro fotográfico, bajo el microscopio invertido de contraste de fases y el microscopio electrónico de barrido.

- Inmunofenotipo

Por medio de inmunofluorescencia, se analizaron por los marcadores específicos de MSCs propuestos por la ISCT: CD73, CD90 y CD105 y el marcador de potencialidad: oct-4.

Entre los subcultivos 1° y 3°, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos sobre laminillas de vidrio (12 mm de diámetro), a una densidad de 5×10^3 células, durante 48h en condiciones estándares de cultivo, pasado este tiempo, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 8 minutos y lavadas con PBS 1X. Las muestras se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con el tampón de bloqueo y permeabilización (4% BSA, 1% FBS, 0.1% tritón en PBS 1X), posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas por una hora a 37°C con los anticuerpo primario: anti-Vimentina (hecho en conejo con #sc-5565 de Santa Cruz Biotechnology® dilución 1:200), anti-oct4 (hecho en conejo con #Ab137427 de Abcam® dilución 1:200), anti-CD73(hecho en conejo con # sc-25603 de Santa Cruz Biotechnology® dilución 1:200), anti-CD90 (hecho en ratón con # Ab23894 de Abcam® dilución 1:200) y anti-CD105(hecho en conejo con #Ab-11414 de Abcam® dilución 1:200), se lavaron en PBS 1X y en ausencia de luz se incubaron con los anticuerpo secundarios: anti-rabbit FITC (hecho en cabra con # cat sc-2012 de Santa Cruz Biotechnology® dilución 1:200), anti-rabbit PE (hecho en cabra con # cat sc-3739 de Santa Cruz Biotechnology® dilución 1:200)y anti-mouse Cy3 (hecho en conejo con # cat. AP124C de merckmillipore.com®) empleando el que correspondía en cada ocasión. Finalmente, se lavaron con PBS 1X y se montaron y contra-tiñeron los núcleos con DAPI (con # cat Sc-300415 de Santa Cruz Biotechnology®). El control negativo se realizó sin el anticuerpo primario y como control positivo se emplearon cortes de placenta obtenidos mediante la donación de este tejido. Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia que se encuentra en la UBIMED de la FESI, y se realizó registro y análisis fotográfico por medio del programa ZEN de Zeiss®.

6.5 Viabilidad y proliferación

Se analizó la viabilidad y proliferación de la población celular obtenida mediante el ensayo de MTT, basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan). Entre los subcultivos 1° al 3°, las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos, a una densidad de 5×10^3 células y se incubaron durante 1, 3, 5, 7 y 14 días. De acuerdo a los días de estudio se incubó el reactivo de MTT con las células durante 4h, pasado este tiempo se retiró el MTT y se incubaron durante 30 minutos con DMSO. Posterior a esto, las muestras fueron evaluadas en un espectrofotómetro para microplacas Epoch, a una longitud de onda de 540nm.

- Diferenciación al linaje osteogénico

Para evaluar la capacidad de diferenciación a la línea osteogénica del cultivo celular obtenido, las células del primer pasaje fueron sembradas en placas de cultivo de 25cm^2 a una densidad de 1×10^6 células, con el medio específico de inducción osteogénica propuesto por Zuk (Zuk *et al.*, 2001) que consistió en DMEM, suplementado con dexametasona $0.1\mu\text{M}$, ascobato-2-fosfato $50\mu\text{M}$, β glicerolfosfato 10mM , 1% antibiótico y antimicótico y 10% FBS. El proceso de diferenciación fue evaluado a 7, 14 y 21 días, realizando cambio de medio cada 48-72 h y confirmado mediante la observación morfológica con ayuda del microscopio invertido, y con la tinción de rojo de Alizarina que evidenció los depósitos de calcio.

6.6 Diseño quirúrgico

Los animales fueron pesados con una balanza granataria y anestesiados y preparados como se describió anteriormente. Con material quirúrgico estéril se ejecutó una incisión de 1.5cm a lo largo del borde inferior de la mandíbula en el lado derecho, realizando disección roma se separaron los músculos masetero y buccinador, y retirando el periostio se dejó expuesto el hueso mandibular. El

defecto se realizó con la ayuda del micromotor Strong 210 y una fresa de bola de $\frac{1}{2}$ a una velocidad menor a 1000rpm, durante la cirugía se realizó irrigación constante con solución fisiológica, las dimensiones del defecto se midieron con una sonda periodontal. El defecto fue diseñado con dimensiones de: 3mm de largo siguiendo el cuerpo de la mandíbula, por debajo de la línea oblicua externa, 2 mm de ancho y 1mm de profundidad (Fig. 8). Se suturó la herida utilizando la técnica por planos con suturas absorbibles de ácido poli-glicólico de 3-0 estériles en el caso del músculo y suturas estériles de seda 3-0 en el caso de la piel. Para evitar infecciones las ratas fueron medicadas con antibiótico Pentrexil® (Ampicilina, 10mg/kg dosis única postquirúrgica), tratadas con analgésico Pisadol® (tramadol 5m/kg durante 3 días cada 24 horas) y mantenidas y monitoreadas hasta el sacrificio de acuerdo con los tiempos de estudio.

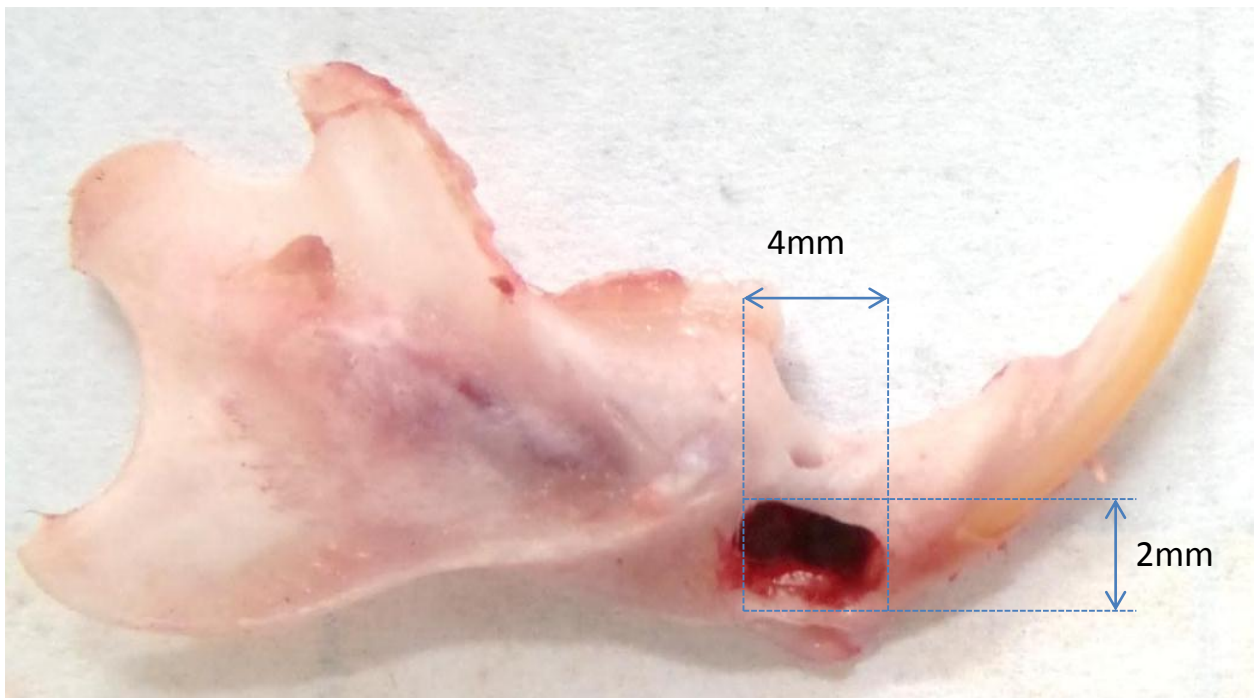


Fig. 8. Modelo de defecto crítico en la cortical mandibular, propuesto por Ramírez en 2015.

6.7 Implante de Terapia Celular autóloga.

Previamente las ADSCs fueron expandidas en condiciones estándares hasta obtener una población de aproximadamente 1.5×10^6 células entre el primer y el tercer pase. Fueron desprendidas de la caja de cultivo por medio de la enzima tripsina, centrifugadas y marcadas por inmunofluorescencia con PKh26, el botón celular se resuspendió en una solución de PKh26 (15 μ l de PKh26 + 135 μ l de Diluyente C) durante 5min, la reacción fue detenida con FBS y la muestra fue centrifugada (Se sembraron algunas de estas células 1×10^3 en un portaobjetos estéril para verificar la positividad del marcaje). El botón celular se recogió con una micropipeta de 0.5-20 μ l y fue colocado dentro del defecto (Fig. 9) y se realizó la sutura.



Fig. 9. Procedimiento del implante celular.

6.8 Evaluación clínica y sacrificio.

Se evaluó la mortalidad, morbilidad y la capacidad de alimentarse de los individuos. Se realizó el registro de observación clínica del área intervenida y se documentó con fotografías. Pasados los tiempos experimentales los animales fueron sacrificados por sobreexposición a CO₂, se tomaron las muestras de estudio (hueso mandibular) y se evaluó el cambio en la conformación del defecto midiendo nuevamente las dimensiones del mismo con una sonda periodontal. Posteriormente, las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% pH7.4 durante 24h para su siguiente procesamiento.

6.9 Evaluación radiográfica.

Inmediatamente después del sacrificio, se les tomó radiografía a los individuos con el equipo ubicado en la CUSI Almaraz de la FES Iztacala utilizando radiografías periapicales con una dosis de radiación de 2.10 milisieverts (mSv) por 45 milisegundos, con angulación de 45 grados en relación a la zona de lesión. Las imágenes radiográficas fueron reveladas con una solución reveladora y solución fijadora, y digitalizadas. La evidencia del defecto creado se observó como una zona radiolúcida o radiopaca en la zona del defecto y se compararon los grupos de estudio.

6.10 Análisis histológico e histomorfométrico de las muestras.

Las muestras ya fijadas con paraformaldehído al 4%, fueron descalcificadas en una solución de Osteosoft® durante aproximadamente 3 semanas, posterior a esto, se realizó una toma radiográfica a fin de observar que se habían descalcificado por completo las muestras, luego se deshidrataron en etanol en

concentraciones ascendentes (70 – 100%), se aclararon con acetato-n-butilo y se embebieron en parafina. Las secciones histológicas se cortaron con un grosor de 5µm en el micrótopo de la UBIMED de la FESI.

Se realizó la tinción de:

- Hematoxilina – Eosina (H&E): para observar las características morfológicas, tiñendo el núcleo de morado y el citoplasma de rosa.

Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico, después de calibrar el sistema con la platina micrométrica de Zeiss, se realizó la digitalización de las imágenes a magnificaciones de 5X, 10X y 40X para la evaluación descriptiva y a 5X para la evaluación histomorfométrica.

La evaluación histomorfométrica consistió en:

- Área total de rellenó: se determinó como la media en µm del área total (de la cavidad original) que se rellenó, tomando como relleno a todo el contenido que se encontrará dentro del espacio creado por el defecto, incluido: infiltrado inflamatorio, diversos tipos de células, vasos sanguíneos, matriz extracelular, tejido conectivo, tejido osteoide y hueso nuevo.
- Área total de hueso nuevo: se determinó la media en µm del área total (de la cavidad original) en que se formó hueso nuevo, tomando como hueso nuevo a todo el tejido con matriz extracelular organizada, lagunas osteocitarias y núcleos de osteocitos, así como organización en forma de osteonas y los vasos sanguíneos dentro del tejido neoformado.
- Medición de la longitud final (aposisión de hueso nuevo): medida de longitud que fue rellenada.
- Medición de la profundidad final (aposisión de hueso nuevo): medida de profundidad que fue rellenada con hueso nuevo que va de ligamento periodontal hacia la cortical.

6.11 Análisis de los resultados histomorfométricos

Los resultados de área total de hueso nuevo fueron evaluados por un estudio de correlación bajo el test de Pearson con una $P \leq 0.005$ con ayuda el software Graph Prisma 5.

7 RESULTADOS.

El presente estudio fue conducido para evaluar el proceso de regeneración ósea a través de la utilización de terapia celular autóloga en un modelo de defecto en la cortical mandibular de rata.

7.1 FASE IN VITRO Obtención de la población celular de ADSCs.

7.1.1 Cultivo y expansión celular.

ADSCs fueron obtenidas del tejido adiposo subcutáneo abdominal de rata Wistar macho por el método de digestión enzimática con colagenasa tipo I y en condiciones estándares de cultivo. Se obtuvieron un total de 30 muestras de tejido adiposo, de aproximadamente 3g cada una, que fueron sometidas al protocolo de aislamiento anteriormente descrito, todas las extracciones resultaron exitosas, es decir, que de éstas se consiguieron un total de 100% de poblaciones celulares correctamente aisladas y viables para su uso como terapia, mostrando características y comportamiento que se menciona a continuación.

A las 24h de cultivo se observaron por microscopio invertido células adherentes a la superficie del plástico, éste fue el principal criterio de selección y las células no adherentes se retiraron en el primer cambio de medio a las 48h (fig.10).

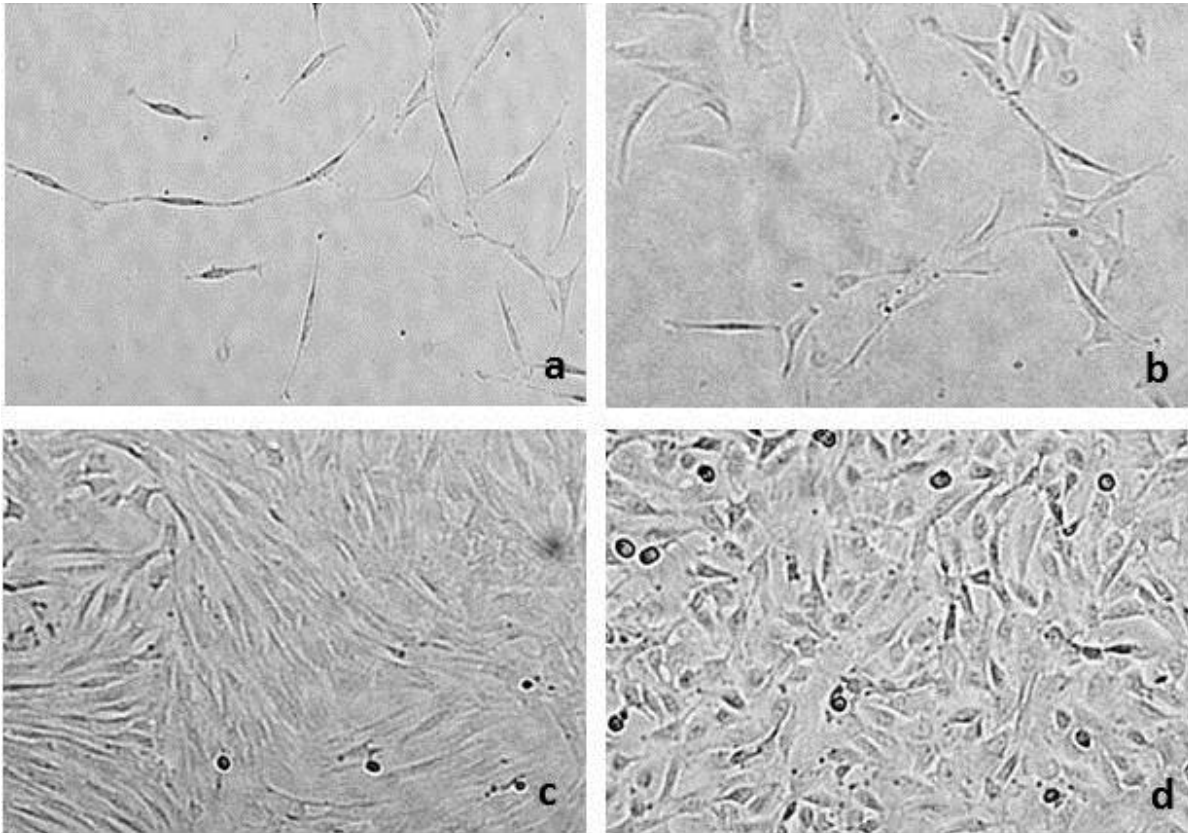


fig. 10. ADSCs de rata. Magnificación 4x. **(a)** Células a las 24h de cultivo. **(b)** Células a las 48h de cultivo. **(c, d)** Células del primero y segundo pasaje, en confluencia.

Morfológicamente se caracterizaron como células alargadas y aplanadas en forma de huso, firmemente adheridas al sustrato, similares a fibroblastos y con un núcleo grande y central, que formaban colonias similares a las CFU-F, con prolongaciones de su citoplasma y varios nucléolos (Fig. 11), mantuvieron esta morfología uniforme durante el número de pasajes realizados, que fueron al menos 3, y alcanzaron el 80% de confluencia entre los 5° y 6° días de cultivo.

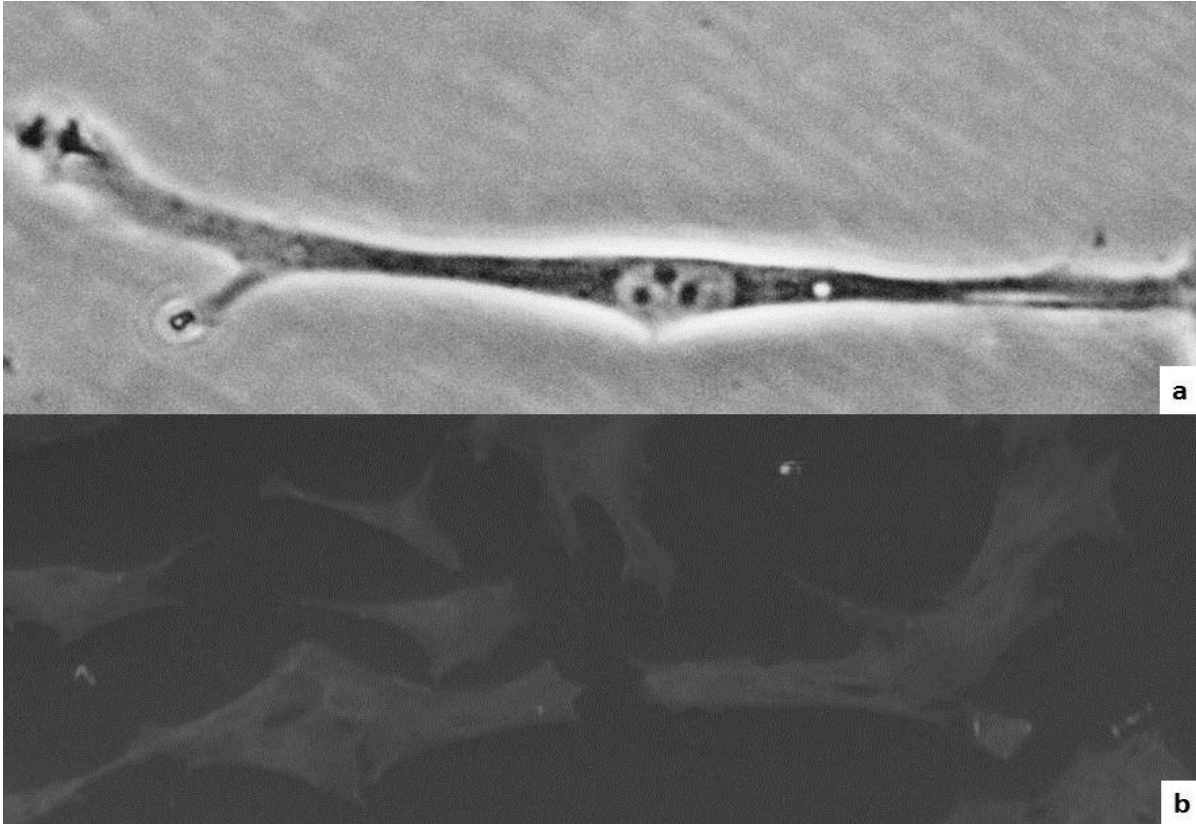


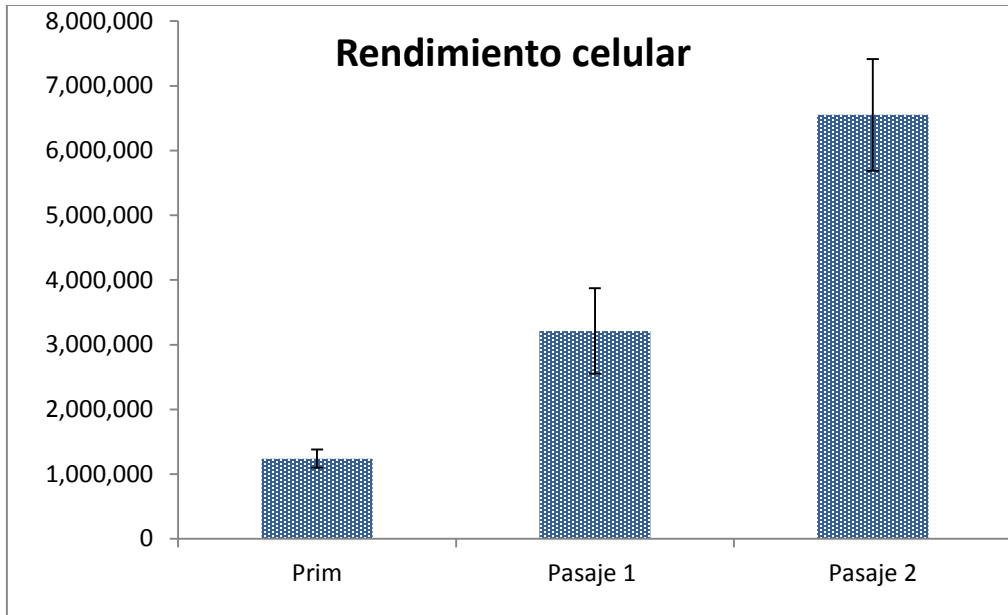
Fig. 11. ADSCs de rata del primer pasaje. (a) Por microscopio invertido, mag. 40x. (b) Por microscopio electrónico de barrido, mag. 129X. Se evidencia su morfología fibroblastoide.

Las células fueron despegadas con la enzima tripsina y teñidas con azul tripano para ser contadas en la cámara de Neubauer. Obtuvimos que de 3g de tejido adiposo se obtuvo un rendimiento promedio de 1.2×10^6 células a los 5 días en el cultivo celular primario, alcanzando cifras de 6×10^6 células a los 9 días en el primer subcultivo (Gráfica 1).

7.1.2 Caracterización fenotípica.

Los marcadores de superficie para MSCs propuestos por la ISCT, fueron evaluados por inmunofluorescencia. Las células de cultivo fueron positivas a los

marcadores específicos CD73, CD90 y CD105 Vimentina, también fueron positivas para el marcador de potencialidad OCT3/4 (Fig. 12).



Gráfica 1. Rendimiento de las ADSCs a partir de 3g de tejido adiposo. Cultivo primario 1.24×10^6 , 3.21×10^6 , 6.55×10^6 .

7.1.3 Viabilidad y proliferación.

El ensayo colorimétrico de viabilidad y proliferación por medio de MTT se evaluó a 1, 2, 3, 4, 7, 10, 11 y 14 días, la absorbancia medida fue a 540nm, que es directamente proporcional a la viabilidad y proliferación de las células. Se obtuvo una gráfica ascendente (Gráfica 2), demostrando así la capacidad proliferativa y de autorrenovación propuesta por la ISCT en 2006.

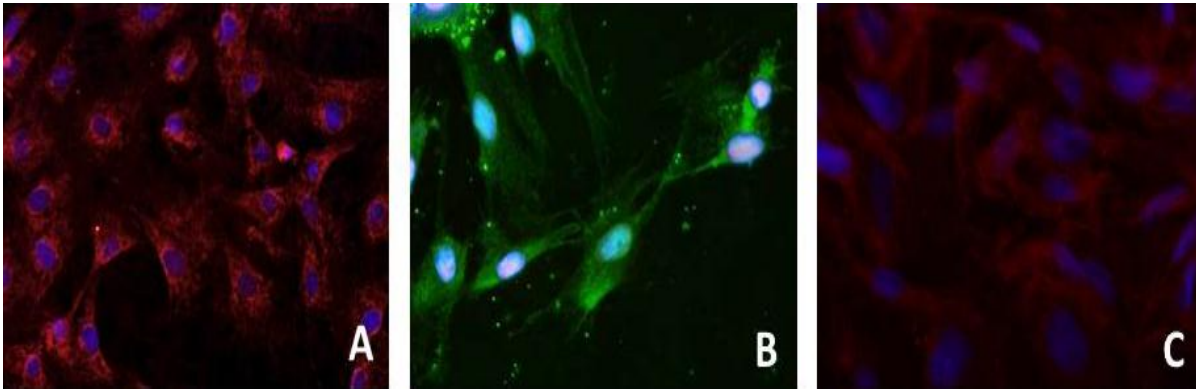
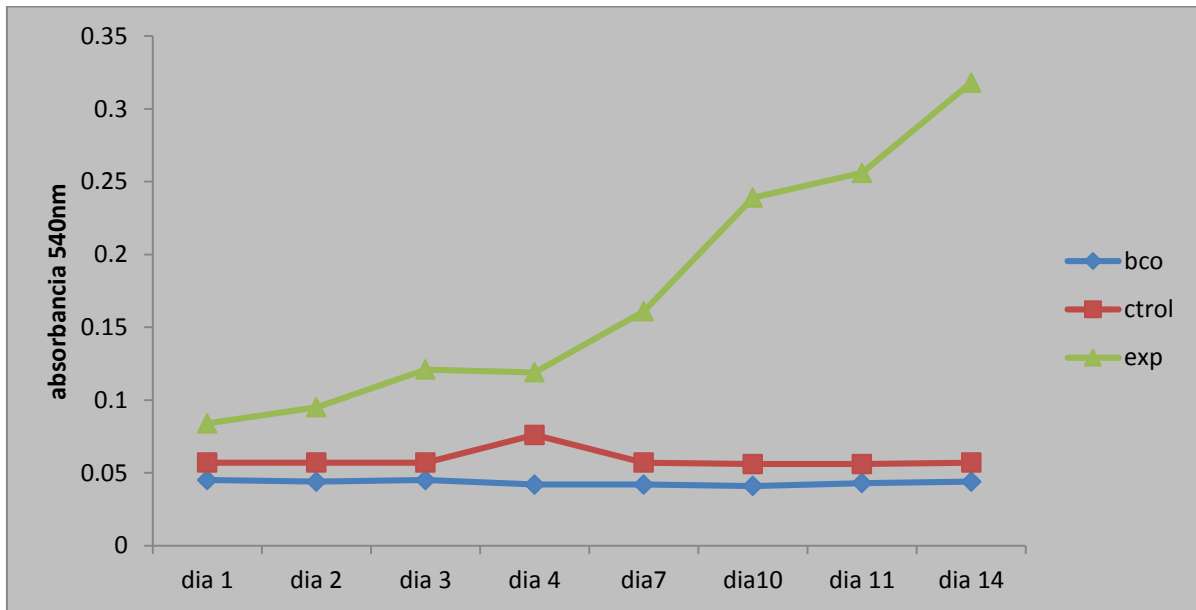


Fig. 12. MSC de tejido adiposo de rata, inmunofluorescencia. Contrastadas en el núcleo con DAPI. A) Expresión positiva de CD90/Cy3), 63X. B) Expresión positiva de Vimentina/FITC , 63X. C) Expresión positiva del marcador embrionario OCT4/PE, 63X.



Gráfica 2. Resultados del ensayo de MTT para determinar la viabilidad y proliferación de las células obtenidas.

7.1.4 Diferenciación osteogénica.

La inducción de las ADSCs a la diferenciación osteogénica por adición de un medio de cultivo osteogénico, produjo cambios como la pérdida de la morfología fibroblastoide, observándose una pérdida de la forma estrellada desde las 96h,

adquiriendo una morfología de tipo cuboide con un núcleo central y un solo nucléolo visible, la velocidad de división celular disminuyó por lo que tardaron más en llegar a confluencia. Las células secretaron cristales de calcio extracelular indicado por la presencia de nódulos de mineralización observados macroscópicamente, esto fue comprobado a 21 días por medio de la tinción de rojo de Alizarina, mientras que no se observó calcificación en las células suplementadas con el medio control (Fig. 13).

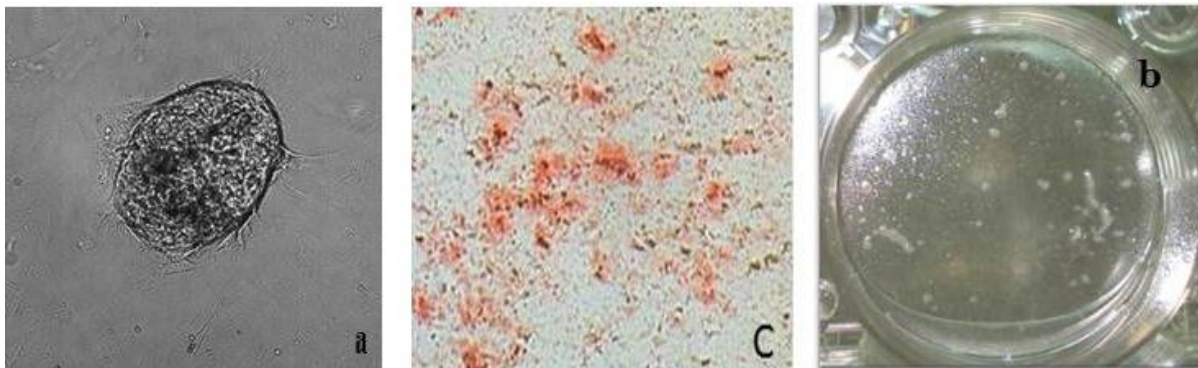


Fig. 13. Inducción osteogénica de las ADSCs a través de un medio de cultivo osteogénico. a) Evidencia microscópica, se observan nódulos de mineralización, desde el día 7. Mag. 4X. b) Evidencia macroscópica, se observan nódulos de mineralización, día 21. c) Se observan nódulos de mineralización teñidos con rojo de alizarina a los 21 días de diferenciación: Mag. 40X.

7.2 Fase IN VIVO Terapia celular autóloga.

7.2.1 Evaluación clínica de los individuos.

Después de realizar las cirugías, esperamos a que los especímenes se recuperaran de los efectos de la anestesia y fueron monitoreados durante todo el tiempo de los experimentos. No se presentaron complicaciones post-operatorias como infecciones o muerte, por lo que mortalidad del presente estudio fue del 0%, además los individuos fueron capaces de alimentarse de manera normal por lo que la morbilidad también fue del 0%. Mantuvieron peso estable y con un aumento acorde a su tamaño y edad.

Desde el momento de la cirugía hasta los 7 días los especímenes presentaron inflamación leve y moderada en la zona de intervención quirúrgica. En cuanto a la cicatrización a los 7 días, la mitad de los especímenes presento cicatrización de más del 30% de la longitud de la herida cutánea, mientras que los individuos restantes (70%) estaban completamente cicatrizados; a los 14 días la herida era apenas perceptible en el 100% de los especímenes sin evidencia de inflamación y/o infección, y así continuaron hasta el término del estudio (figura 14).

7.2.2 Evaluación post mortem.

Como parte de los resultados, se realizó el registro fotográfico, a fin de llevar a cabo la inspección y auscultación de cada uno de los especímenes y posteriormente, de la muestra. Como se observa en la figura 15, apreciamos el defecto al tiempo cero (SHAM=T0) en donde la cavidad está completamente vacía con las dimensiones propuestas en el diseño quirúrgico (4 x 2mm).

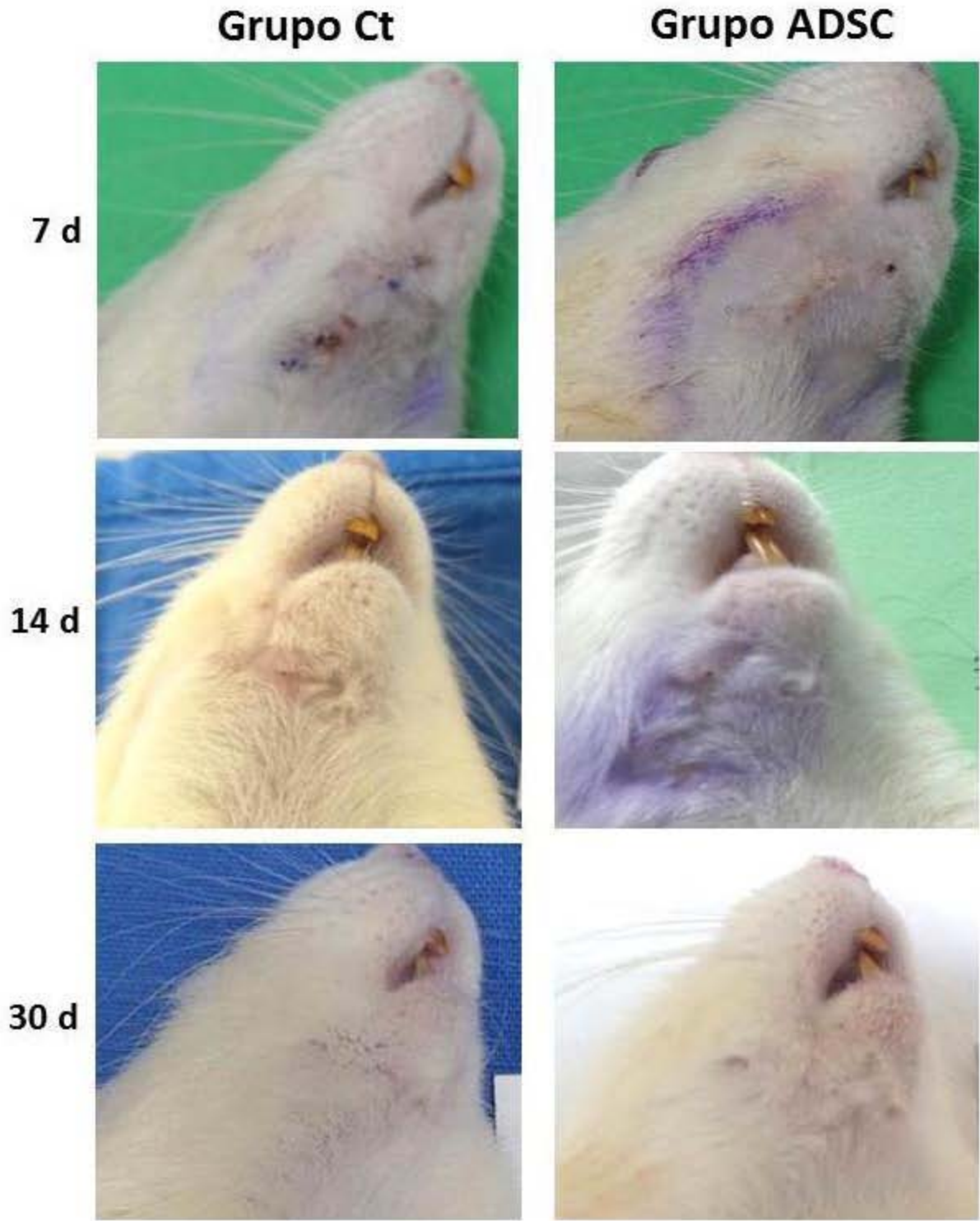


Fig. 14. Evaluación clínica de los especímenes. A 7 días presentaron inflamación leve, la mitad de los individuos mostraron 30% de cicatrización de la herida cutánea. A 14 días el 100% estaba cicatrizado.

Sano

T0



Fig. 15. Evaluación post-mortem. Evaluación macroscópica, se muestran el grupo Sham y la mandíbula en condiciones normales.

En la figura 16 se observan las muestras representativas de los grupo evaluados. En el grupo ADSC a los 7 días se observó la zona del defecto, con las dimensiones originales, pero a comparación del grupo T0 la cavidad se encontró relleno de tejido blando; en el grupo experimental de ADSC14 días se apreció que el área del defecto disminuyó, presentando dimensiones menores a las del defecto original, de aproximadamente 1 x 3mm, condiciones similares se observaron en el grupo ADSC21 días; en el grupo ADSC30 días se observó el defecto relleno y en algunos de los especímenes fue visible una capa de tejido blando unido a la zona del defecto.

En el grupo ADSC60 días el área del defecto se apreciaba de manera clara y comenzaba a observarse el tejido óseo de la cortical mandibular como un tejido continuo. Por estas observaciones macroscópicas, podemos pensar que a los 60 días en el grupo tratado con ADSCs el defecto regeneró completamente o al menos estaba completamente relleno sin sobrepasar los límites del mismo, ya que tampoco observamos crecimientos exagerados de tejido en ninguno de los especímenes.

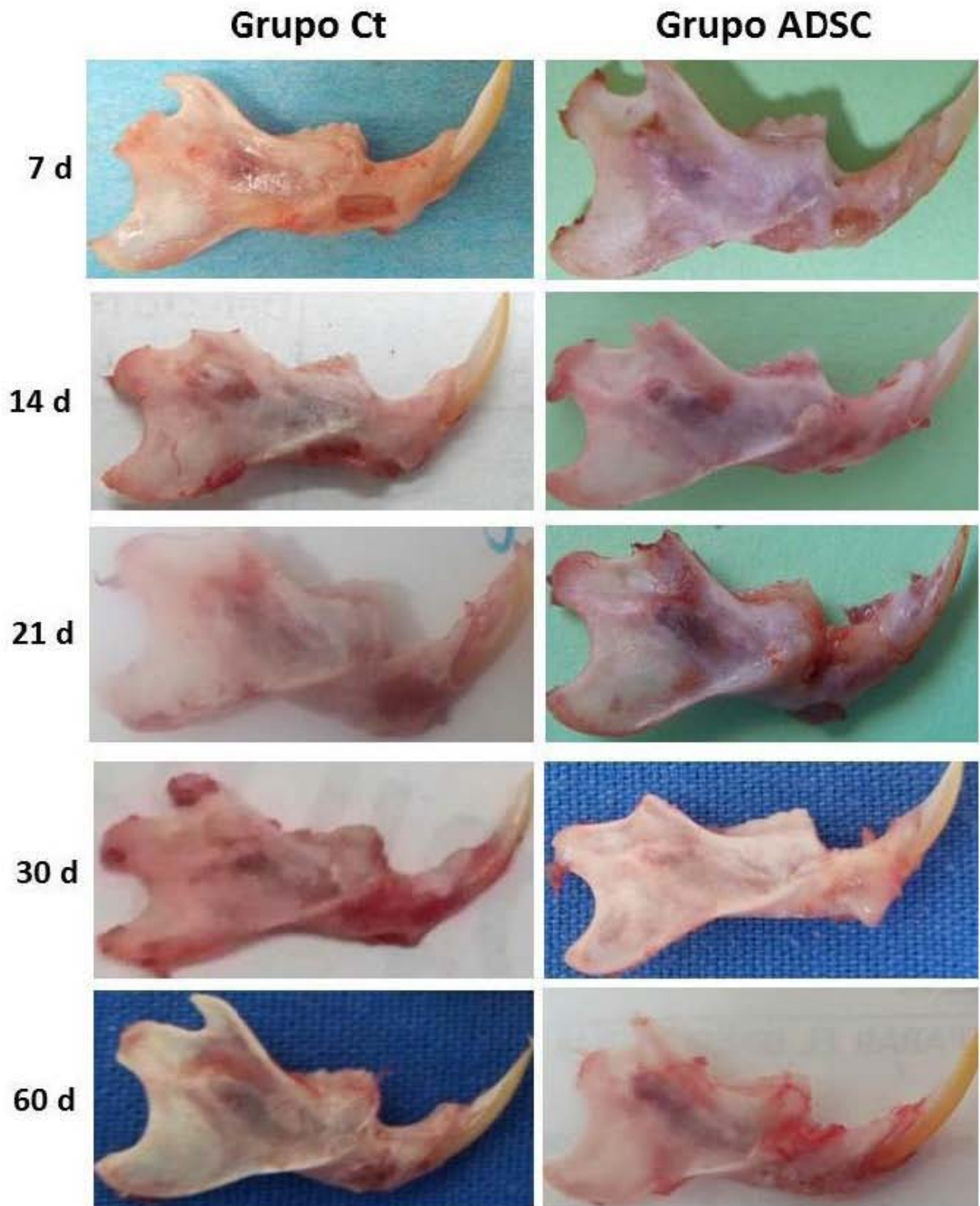


Fig. 16. Evaluación post-mortem. Evaluación macroscópica de la curación de la zona de defecto a los diferentes tiempos de estudio, comparación entre los grupos experimental y control.

7.2.3 Análisis radiográficos.

Se realizaron tomas radiográficas en el momento de la obtención de la muestra para evaluar la presencia del defecto en ellas. La zona radiolúcida delimitada observable en la mandíbula, debajo de los molares corresponde al defecto creado, fue observable desde la primera radiografía postoperatoria de tiempo 0 hasta los 21 días del grupo ADSC, después el defecto ya no fue evidente radiográficamente, ya que la zona mandibular está completamente radiopaca (fig. 17).



Fig. 17. Análisis radiográfico a diferentes tiempos de estudio.

7.2.4 Seguimiento de las ADSCs implantadas.

Las ADSCs antes de ser implantadas fueron marcadas con el fluoróculo de PKH26. Después de 7 y 14 días de tratamiento corroboramos que las células permanecieron en el sitio de la lesión, a los 21 días aún fueron detectadas pero en menor cantidad, sin embargo a los 30 y 60 días después de haber realizado la terapia, las células ya no fueron detectadas (Fig. 18).

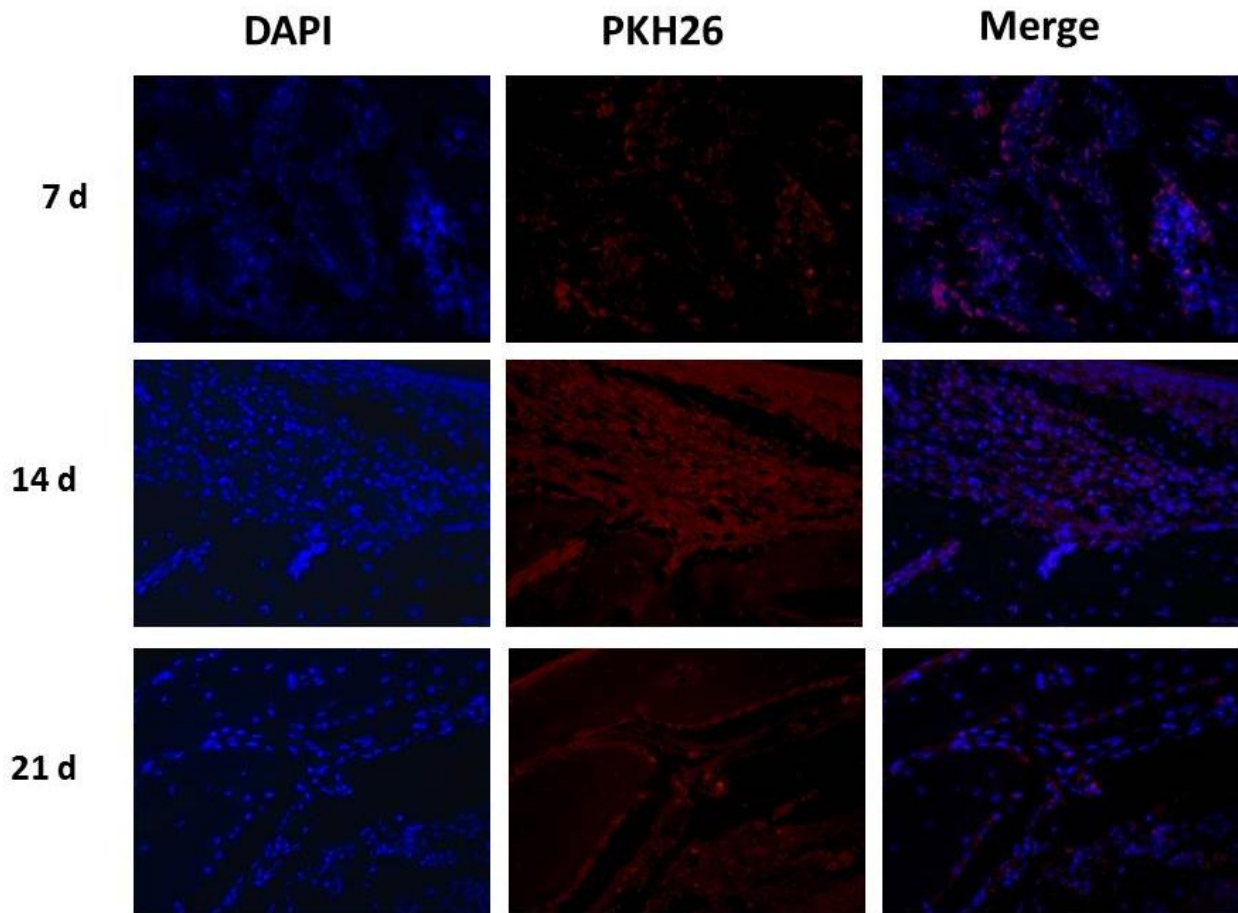
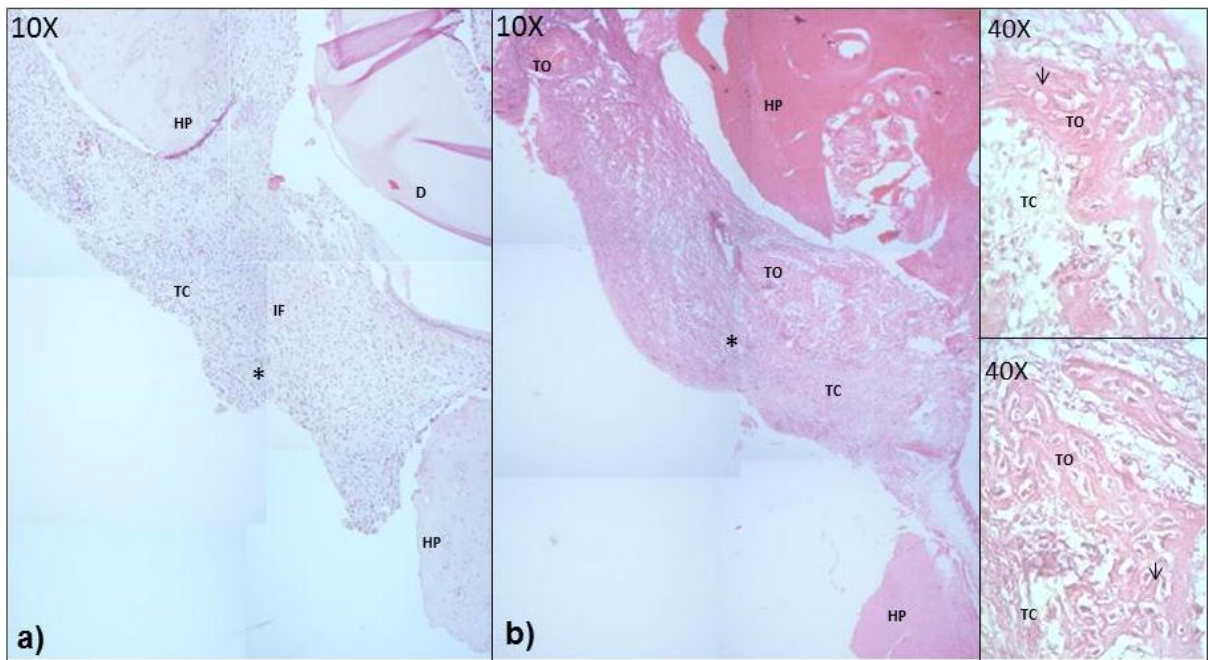


Fig. 18. Seguimiento de las ADSCs implantadas por el fluoróculo PKH26. Evidente la presencia de las células en la zona del defecto a los 7 días de tratamiento y disminuida a los tiempos de 14 y 21 días.

7.2.5 Tinción de Hematoxilina – Eosina.

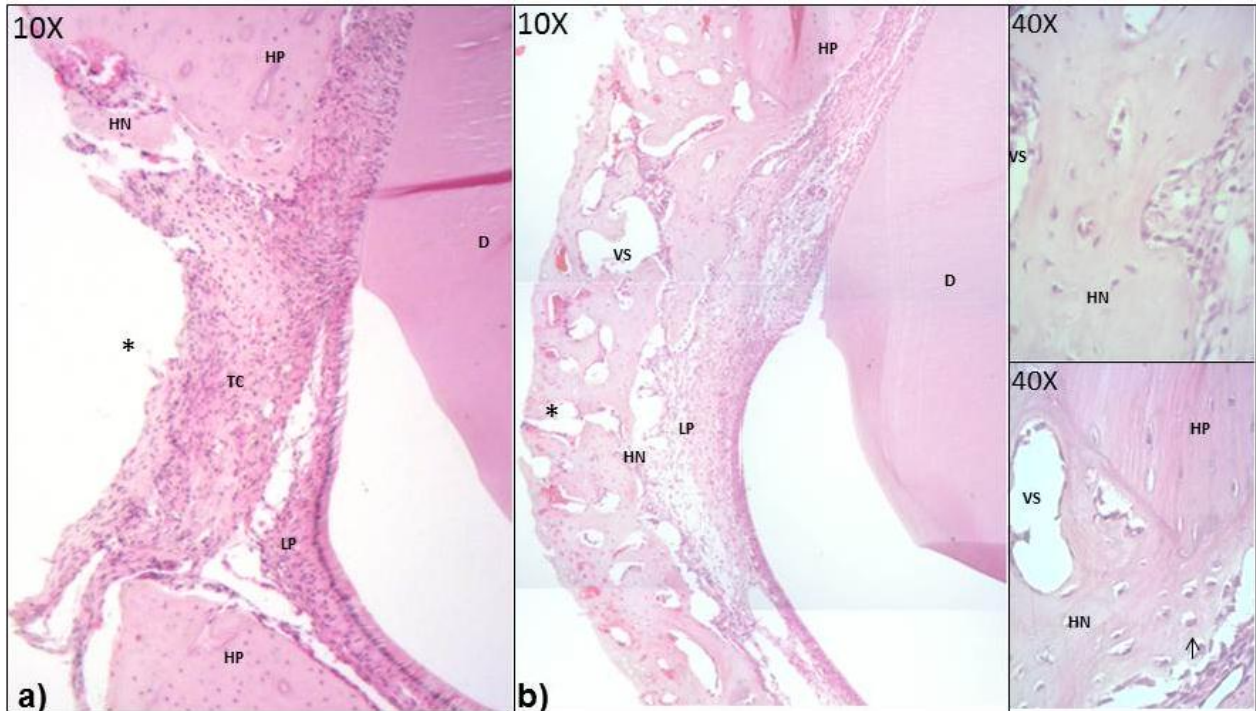
A los 7 días se observó el defecto relleno de tejido conectivo, así como infiltrado inflamatorio abundante en células de aspecto linfoide en la zona, en ambos grupos, experimental (ASDC7d) y control (Ct7d), sin embargo en el grupo experimental se observan áreas en forma de islotes con mayor organización celular, con características propias de tejido osteoide (fig.19).



*Fig. 19. Fotomicroscopía óptica, tinción H-E. a) Grupo Ct7d b) Grupo ASDC7d a 10 y 40x. D-dentina, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, IF-infiltrado inflamatorio, TO-tejido osteoide, * área de defecto, ↓ osteocito inmaduro.*

En el grupo Ct14d se observó aún discontinuidad del tejido óseo en la zona del defecto que ha sido rellenada por tejido conectivo de aspecto fibroso, en comparación con el grupo ASDC14d en el que 4 de los 6 especímenes presentaron áreas vascularizadas y más zonas de tejido osteoide dentro del defecto, así como, zonas de hueso nuevo con matriz extracelular organizada, lagunas osteocitarias y núcleos de osteocitos, observamos regeneración del defecto en islotes, lo que sería desde el centro a la periferia, y también de la

periferia hacia el centro. También se reveló la presencia de células de la línea ósea lo que indicó la osificación intramembranosa directa. En uno de los 6 individuos se observó formación ósea completa con gran cantidad de vasos sanguíneos (fig. 20).



*Fig. 20. Fotomicroscopía óptica, tinción H-E. a) Grupo Ct14d b) Grupo ADSC14d a 10 y 40x. D- dentina, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, LP-ligamento periodontal, VS- vaso sanguíneo, HN-hueso nuevo, * área de defecto, ↑ osteocito maduro.*

En el grupo Ct21d se observó la discontinuidad del tejido óseo a causa del defecto, podemos observar en el hueso cortical de los bordes osteocitos de apariencia normal, lo que nos permite descartar osteonecrosis, sin embargo, el defecto aún sigue relleno casi en su totalidad de tejido de tipo conectivo fibroso con infiltrado inflamatorio en algunas áreas. Por otro lado, en el hueso cortical adyacente al defecto se observan áreas de remodelación con presencia de tejido osteoide y en algunas áreas presencia de hueso nuevo (probablemente ya mineralizado). En el grupo ADSC21d la formación de hueso nuevo en el área del defecto fue evidente, el hueso ya es continuo por lo que el defecto está relleno y aparentemente la barrera cortical externa es continua, en su interior se encontró

que prácticamente ya no hay tejido conectivo fibroso, y en su lugar se observa tejido osteoide en proceso de mineralización con abundantes células de la línea ósea en el periferia lo que indica la presencia de osificación intramembranosa con abundantes vasos sanguíneos. En comparación en el grupo Ct21d se observó gran cantidad de tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos de diferentes calibres y abundantes células con aspecto fibroblastoide (fig. 21).

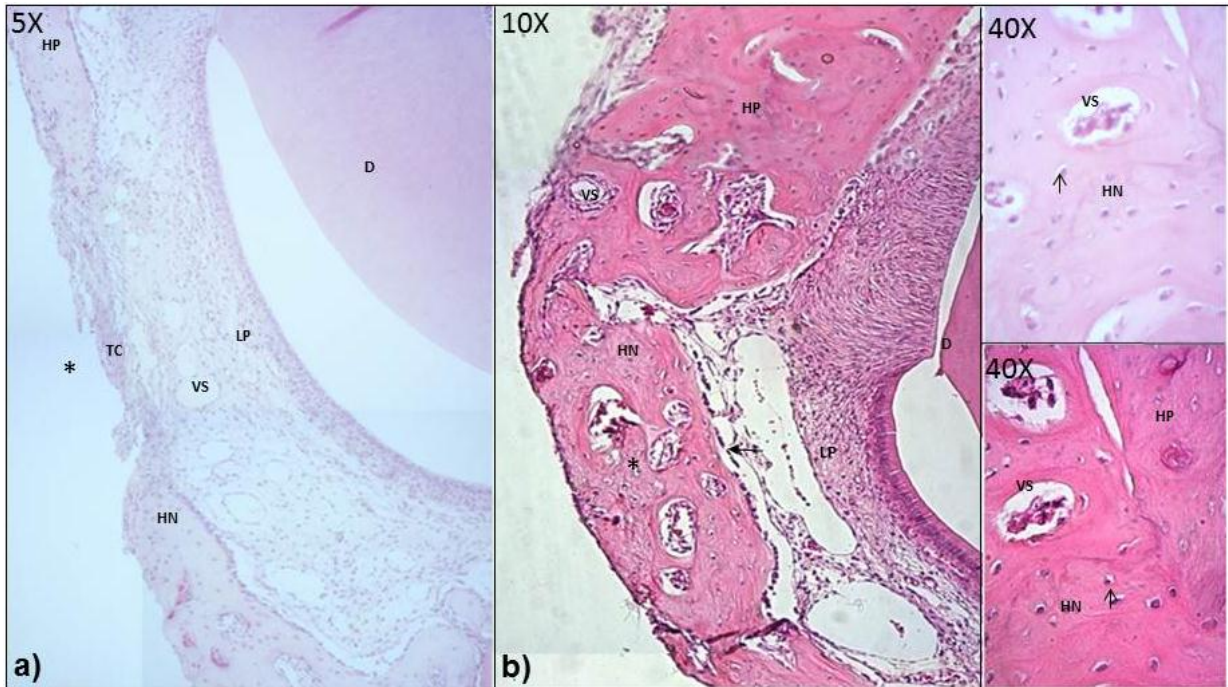


Fig. 21. Fotomicroscopía óptica, tinción H-E. **a)** Grupo Ct21d **b)** Grupo ADSC21d a 10 y 40x. D- dentina, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, LP-ligamento periodontal, VS- vaso sanguíneo, HN-hueso nuevo, * área de defecto, ↑ osteocito maduro, ← células de la línea ósea.

En el grupo Ct30d se observó regeneración ósea de la periferia hacia adentro, fue evidente la formación de una lámina de tejido cortical delgada con presencia de algunas células con apariencia osteocitaria y fibroblastoide, que rellena el defecto creado en longitud pero no en profundidad. Esta delgada capa cortical se observa con todas las características de hueso nuevo. En el grupo ADSC30d, aunque con respecto al control las diferencias ahora son menos evidentes, en general observamos regeneración ósea que rellena el área del defecto con la formación de la lámina cortical que en longitud casi rellena el espacio total del defecto y que en

profundidad se observó mayor longitud que en el control, es decir alcanza las dimensiones ideales del hueso mandibular en esta área anatómica (fig. 22).

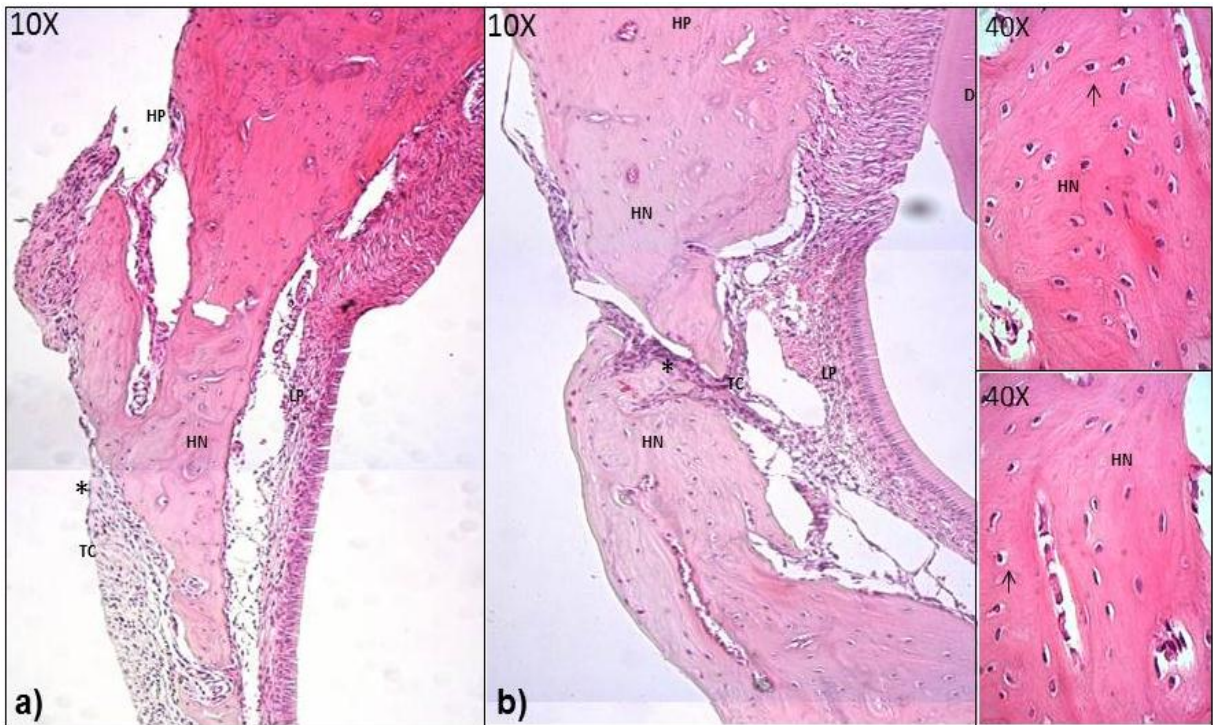


Fig. 22. Fotomicroscopía óptica, tinción H-E. **a)** Grupo Ct30d **b)** Grupo ADSC30d a 10 y 40x. D- dentina, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, LP-ligamento periodontal, VS- vaso sanguíneo, HN-hueso nuevo, * área de defecto, osteocito maduro.

En el grupo Ct60d hay formación de una lámina de tejido cortical pero que aún no termino de cerrar completamente y no alcanzó a rellenar el defecto en cuanto a su profundidad y sólo hay presencia de una pequeña cantidad de tejido conectivo en lo que ahora sería la superficie externa del defecto. En el grupo ADSC60d el hueso ha regenerado completamente, no hay presencia de tejido conectivo fibroso, sólo tejido óseo, y el proceso de angiogénesis que observamos a los tiempos menores ya no fue observado, ya que se observó menor cantidad de vasos sanguíneos y en su lugar se observan estructuras similares a los canales haversianos de las osteonas, es difícil discernir entre hueso adyacente y hueso nuevo. A pesar de que podemos observar que el hueso es continuo, se distingue la zona del defecto en algunos de los especímenes por ser un área más delgada,

con menor profundidad. De manera general, podemos decir que son muy pocas las diferencias histológicas encontradas entre los grupos Ct60d y ADSC60d (fig. 23).

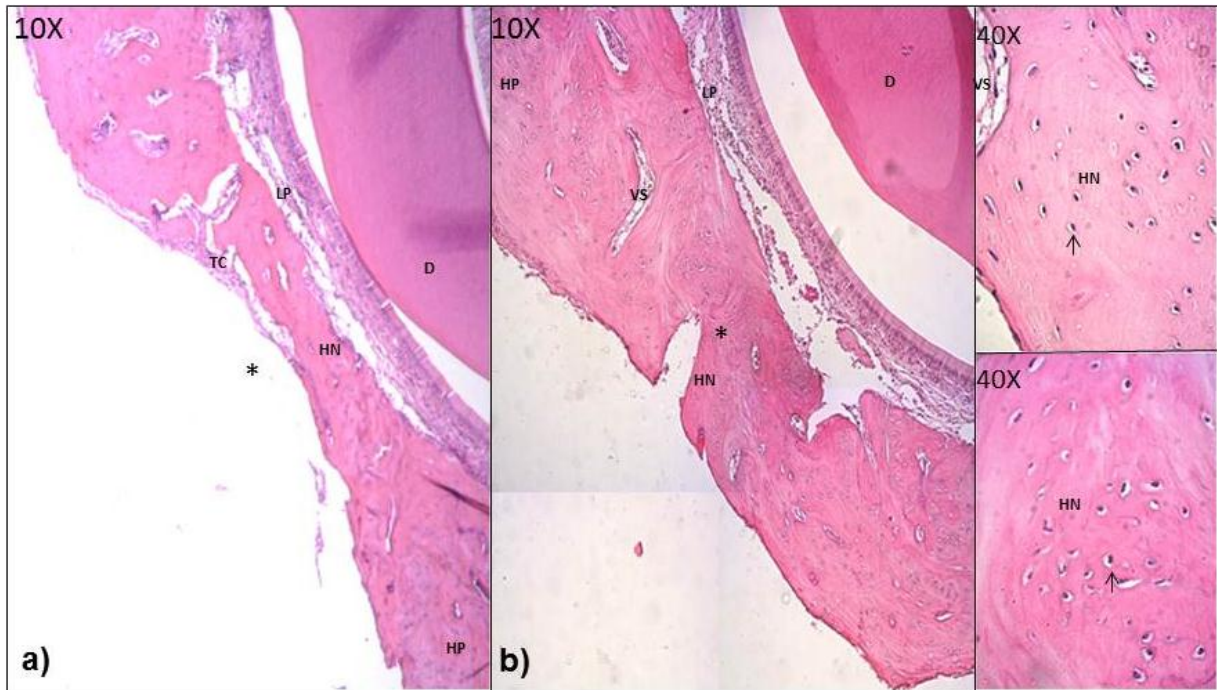


Fig. 23. Fotomicroscopía óptica, tinción H-E. **a)** Grupo Ct60d **b)** Grupo ADSC360d a 10 y 40x. D- dentina, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, LP-ligamento periodontal, VS- vaso sanguíneo, HN-hueso nuevo, * área de defecto, ↑ osteocito maduro.

7.2.6 Análisis histomorfométrico.

El análisis histomorfométrico se realizó con ayuda del programa Zen 2 (blue edición) de ZEISS®, para establecer valores en cuanto al tamaño en μm de la cavidad que se rellenó, de hueso nuevo, así como la longitud y profundidad final, con relación a las dimensiones originales del defecto en los grupos control y en los grupos de ADSCs.

➤ Relleno de la cavidad.

El relleno de la cavidad se determinó como la media en μm del área total (de la cavidad original) que se rellenó incluyendo tejido conectivo y tejido óseo. Podemos

observar en la Tabla 2 que en ambos grupos (Ct y ADSC), en todos los tiempos evaluados el resultado fue muy homogéneo, esto quiere decir que tanto en los grupos controles como en los experimentales, por lo menos al día 7 de tratamiento no se observa una cavidad, si no que la zona de defecto fue rellena completamente, y como se observó en la histología fue ocupado con tejido conectivo, diferentes tipos celulares, vasos sanguíneos, infiltrado inflamatorio y/o tejido óseo, indicando una buena respuesta inflamatoria y descartando la presencia de necrosis o infección.

Tabla 2. Se muestra el área total de relleno y el área total de hueso nuevo en μm , en relación con el área total del defecto.

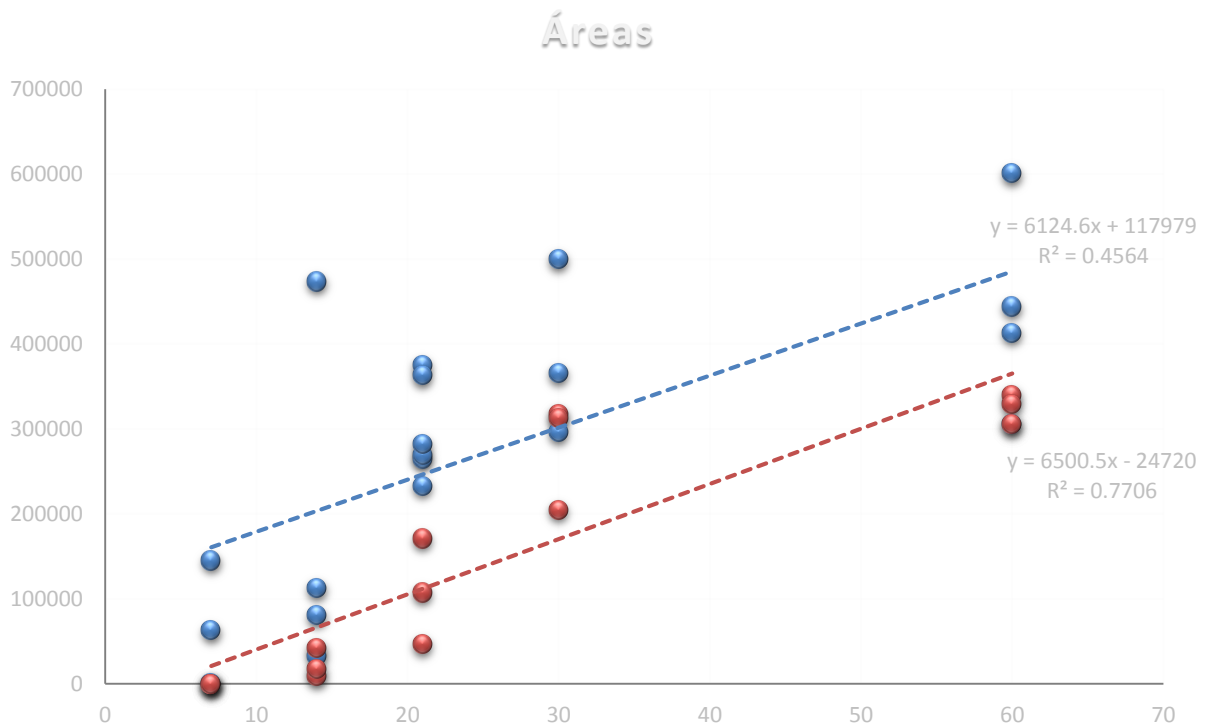
		Relleno		Hueso	
		Media (μm)	Desvest (μm)	Media (μm)	Desvest (μm)
7d	Ct	524225	193941	0	0
	ADSC	462118	138965	69737	72329
14d	Ct	514101	262750	22451	17202
	ADSC	457090	113370	174969	201645
21d	Ct	590900	86029	108442	62268
	ADSC	470948	179494	298135	57535
30d	Ct	608027	139135	278580	63652
	ADSC	412325	144582	387468	103299
60d	Ct	377920	104914	324993	17594
	ADSC	455122	121010	440921	122006

➤ Hueso nuevo.

Hueso nuevo fue la media del área que se relleno con hueso, sin contar el tejido conectivo y se determinó la media en μm del área total. A pesar de que como vimos el área de defecto en todos los grupos se relleno completamente, no en

todos los grupos este relleno fue hueso. Como se observó en la histología se trata también de tejido conectivo e infiltrado inflamatorio, matriz extracelular desorganizada, vasos sanguíneos y distintos tipos celulares. En general, los grupos experimentales tuvieron una medida mayor que los grupos Ct, siendo el grupo ADSC60d ($440921 \pm 122006 \mu\text{m}$) con la medida más alta y los grupos Ct14d y Ct7d con las medidas más bajas (22451 ± 72329 y $0 \mu\text{m}$) (tabla 2).

Por otro lado y contrario al resultado al obtenido en el parámetro de relleno, por medio de un análisis de correlación (prueba de correlación de Pearson) se observó en ambos grupos una correlación positiva, es decir, una tendencia de aumento de cantidad de hueso a medida que aumentó el tiempo de estudio, pero además se observan diferencias evidentes entre los grupos de estudio observándose que el grupo ADSCs tuvo mejores resultados que el grupo Ct (Gráfica 3).



Gráfica 3. Se muestra la dispersión de las medidas de área total de hueso nuevo, mediante la prueba de correlación de Pearson. En Azul grupo ADSCs y en rojo grupo Ct.

➤ Longitud y profundidad del defecto.

La longitud final del defecto se determinó como la medida en μm del defecto yendo de cortical a cortical, de igual manera las longitudes disminuyeron a medida que los tiempos de estudio avanzaron, en este caso la diferencia entre los grupos Ct y ADSC no fue tan evidente como en el parámetro del hueso nuevo. La profundidad final se determinó como la medida en μm del defecto yendo de ligamento periodontal hacia el hueso cortical, de igual manera las dimensiones disminuyeron a medida que los tiempos de estudio aumentaron, es posible observar que en los grupos Ct la profundidad fue ligeramente mayor en los grupos ADSC, sin embargo ni uno de los dos disminuyó hasta cero, esto debido que la capa cortical nueva no alcanzó las dimensiones originales que debería tener la zona anatómica (Tabla 3).

Tabla 3. Se muestra la dispersión de las medidas de profundidad del defecto. En Azul grupo ADSCs y en rojo grupo Ct.

		Longitud		Profundidad	
		Media	desvest	Media	desvest
7d	Ct	1552	341	420.9	103.8
	ADSC	1694	84.1	452.9	52.46
14d	Ct	1634	134	444.5	102.2
	ADSC	1277	494	299.9	171.7
21d	Ct	1241	435	439.3	85.76
	ADSC	1317	548	167.6	56.39
30d	Ct	1045	27.4	145.9	70.74
	ADSC	618	714	63.18	57.24
60d	Ct	1139	307	191.4	56.97
	ADSC	1158	391	134.8	47.25

8 DISCUSIÓN.

El tejido adiposo es considerado por algunos autores (Cinti, 2001; Wang & Yang, 2016) como un órgano debido a su organización compleja en múltiples depósitos. Cada depósito tiene su propio suministro vascular y nervioso; y como órgano, el tejido adiposo cumple sus funciones de acuerdo a las necesidades del organismo, principalmente en relación a su función endócrina, balance energético, la termorregulación y la inmunidad; y desde la publicación de Zuk *et al.*, 2001 se ha considerado también, como una excelente fuente de MSC abundantes.

Desde la identificación de las células troncales de Médula ósea por Friedenstein (Friedenstein *et al.*, 1974) hace más de 40 años, las MSCs constituyen una herramienta dentro de la Ingeniería de Tejidos, no obstante, en los últimos años se ha demostrado por numerosos autores (Bajek *et al.*, 2016; Lindroos *et al.*, 2011; Zuk *et al.*, 2002) las ventajas que tienen las MSC de tejido adiposo (ADSC) sobre otras fuentes, como son: la facilidad de extracción de tejido adiposo con un método no invasivo, en casos como en las liposucciones, lipoaspirados, lipoesculturas y lipectomías, es un tejido de desecho (que normalmente proviene de una persona sana), psicológicamente es mejor aceptado por el paciente donar tejido adiposo, así como el éxito de extracción y rendimiento. A este respecto, en el presente trabajo logramos un éxito del 100% comparado con otras fuentes como, el cordón umbilical en donde reportan un éxito de extracción de tan solo el 15% (Jin *et al.*, 2013); así como en el rendimiento en el que ha sido previamente reportado por Meza *et al.*, 2008 de 1g de tejido adiposo se pueden aislar 5×10^3 células troncales, que es 500 veces más células que a partir de una cantidad equivalente de la médula ósea (El-Kehdy *et al.*, 2016) se ha reportado que su rendimiento promedio es de 0.001%-0.01% en 6×10^6 células nucleadas por mililitro de aspirado (Fraser *et al.*, 2006), referente a esto nosotros tuvimos nuestras poblaciones celulares en las que logramos obtener un rendimiento de más de un millón de células a partir de 3 gramos de tejido adiposo en un tiempo de cultivo menor a 7 días.

En los estudios de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos, además del uso de un andamio apropiado y moléculas de crecimiento que estimulen el microambiente a la regeneración (Meijer *et al.*, 2008), el uso de células troncales es la clave, ya que las células además de ser la unidad mínima funcional del tejido a regenerar, también proveen de señales moleculares para el reclutamiento de células a partir del propio tejido y poseen propiedades inmunomoduladoras ya que numerosos estudios han demostrado que las MSC (Agata, 2003), incluidas las ADSC (Davis *et al.*, 2014) pueden suprimir la activación y la función de diversas células de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, incluyendo macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales, células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B, que en conjunto benefician el microambiente de regeneración (Molina *et al.*, 2015), además, debido a la potencialidad que estas tienen de diferenciarse a otros tejidos. Es por ello, que la obtención y el mantenimiento de las MSCs representan un paso crítico en la aplicación de la Terapia Celular, ya que las MSCs deben ser extraídas, expandidas y replicadas sin alterar su potencial terapéutico, cantidad, seguridad y en condiciones de esterilidad.

Para la obtención de ADSCs, se han considerado protocolos de extracción por técnicas enzimáticas y no enzimáticas. El método de extracción que nosotros hemos empleado es la técnica enzimática, y nos ha permitido obtener una población celular estable, al contrario de los resultados reportados por Zuk y cols (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002a), en los que indican que los cultivos de las ADSCs humanas tienen un retraso inicial de 7 días, en este estudio con ADSCs de rata, nosotros observamos células adherentes a la superficie de cultivo desde las 24h posteriores a la extracción celular, alcanzando confluencia del 80% a los 5 días en el cultivo primario. Por lo que nuestros resultados, concuerdan más con los estudios realizados por Cowan *et al.*, 2004, donde ellos indican que las ADAS alcanzan confluencia en sólo 3 días, comparado con otras fuentes celulares como las BM-MSCs que requieren de 2-3 semanas para alcanzar la confluencia. Estos resultados pueden ser debidos a amplia estandarización previa que hemos realizado de la técnica de obtención celular.

Según un estudio las ADSC han demostrado que poseen mayor capacidad proliferativa y capacidades angiogénicas *in vitro* en comparación con el BM-MSC (Guneta *et al.*, 2016). Sí bien, nosotros no realizamos un estudio comparativo, nuestra población celular demostró esta capacidad de proliferación en los ensayos realizados con MTT desde 1 hasta 14 días, la población obtenida demostró aumento en la viabilidad celular probando que cumple con la condición de autorrenovación que postula la ISCT.

También, autores como Meza *et al.*, 2008 han demostrado que las ADSC son genéticamente estables a largo plazo y poseen una gran plasticidad (Parker & Katz, 2006), con relación a esto nosotros no realizamos más estudios de diferenciación que al tejido de nuestro interés, el tejido óseo. No obstante, numerosos estudios evidencian la capacidad de las ADSC a diferenciarse a múltiples estirpes como: tejido adiposo (Martella *et al.*, 2014), cartílago (Zuk *et al.*, 2002a), cardíaco (Nagata *et al.*, 2016), miofibroblastos (Rinella *et al.*, 2016), hepatocitos (El-Kehdy *et al.*, 2016), urotelio y músculo liso (Zhao *et al.*, 2016), neuronales (Ashjian *et al.*, 2003), células epiteliales (Brzoska *et al.*, 2005), entre otras. Cabe mencionar que nuestros estudios de diferenciación al linaje osteogénico resultaron exitosos logrando una diferenciación en un plazo de 21 días acorde con los antecedentes bibliográficos (Linero & Chaparro, 2014; Luna *et al.*, 2014; Zuk *et al.*, 2001).

El cultivo celular primario se observó heterogéneo, mientras que en los pasajes subsecuentes se observó más homogéneo, predominantemente con células alargadas con morfología similar a fibroblastos. Estas observaciones concuerdan con los reportes previos en humanos (Zuk *et al.*, 2001; Riekstina *et al.*, 2011) y ratones (Levi *et al.*, 2011). También se ha observado esta morfología en BM-MSCs y cordón umbilical (Jin *et al.*, 2013) lo que sugiere que las características morfológicas de la población celular obtenida son típicas para MSCs de diferentes especies y para diferentes tejidos adultos.

La expresión de marcadores de superficie propios de MSCs se realizó de acuerdo con los principios propuestos por la ISCT (Dominici, 2006). Las células fueron CD73+, CD90+ y CD105+. Vimentina+ y OCT4+.

Además de los marcadores de membrana propuestos por la ISCT se decidió realizar la identificación de Vimentina mediante inmunofluorescencia, ya que está considerada como la principal proteína del fenotipo mesenquimal y se utiliza como un marcador de desarrollo de células y tejidos; estudios recientes demuestran que está implicada en adhesión, migración y señalización celular (Johanna Ivaskaa, 2007). También se decidió realizar la evaluación de la expresión del marcador embrionario OCT4, un marcador de pluripotencia de las ESCs (Boiani & Scholer, 2005; Z. Wang et al., 2012), y algunos autores sugieren la regulación directa o indirecta de este factor de transcripción en MSCs para inhibir la diferenciación, regula el ciclo celular, también se ha encontrado que tiene perfiles de genes diana similares a ESCs. Por lo que se cree, que interviene en la plasticidad (Greco *et al.*, 2007). Y nuestra población celular demostró ser positiva para este marcador en más de un 90% durante el primer subcultivo.

En general, podemos decir que los modelos animales pequeños constituyen un punto de partida para los estudios iniciales o de viabilidad antes de pruebas clínicas de eficacia en animales más grandes (Shanbhag *et al.*, 2006), por lo que este tipo de modelos, como el nuestro en rata Wistar, permite observar la viabilidad y seguridad en el empleo de células autólogas que es un paso inicial en la investigación para llevarlo a la aplicación en la terapia clínica humana. De todos los estudios que revisamos sobre el uso de ADSCs con fines terapéuticos, no encontramos algún reporte en el que se mencionaran complicaciones o desventajas del uso de estas células, por el contrario encontramos que Chan y cols (Ra *et al.*, 2011), en su trabajo evaluaron la seguridad de la aplicación de hADSCs aplicando diferentes dosis (baja 2×10^6 cel/kg; media 2×10^7 cel/kg; alta 2×10^8 cel/kg) por vía intravenosa en ratones y concluyeron que éstas no provocan efecto de toxicidad y no inducen el desarrollo de tumores en ninguna de las dosis. En el presente trabajo no observamos morbilidad ni mortalidad de los especímenes durante el tiempo de estudio, tampoco se revelaron signos de toxicidad o presencia de neoplasias en los grupos experimentales por lo que, podemos decir que el uso de ADSC autólogas es seguro.

Consideramos que el modelo de diseño quirúrgico del defecto es importante pues no representa un defecto fácil de regenerar, ya que la zona de hueso cortical mandibular se caracteriza por la falta de vascularidad y la médula ósea limitada. Al respecto cuando aplicamos la terapia celular autóloga de ADSCs indiferenciadas, histológicamente se observaron diferencias marcadas en el proceso de regeneración del defecto óseo entre los grupos control y experimental, no obstante, para descartar que la regeneración haya ocurrido por la propia capacidad del hueso de repararse por los mecanismos de osteoinducción y remodelado óseo, surge la necesidad de corroborar la presencia de las células implantadas en la zona de defecto. Además estudios previos reportan bajas tasas de diferenciación y supervivencia de las células cuando son implantadas. Linero y cols. En un defecto óseo, implantaron ASCs marcadas por inmunohistoquímica con el anticuerpo β -2 microglobulina, las detectaron a los 3 días de manera clara, a los 6 en cantidades muy bajas y a los 14 días del implante ya no las detectaron, un estudio similar implantaron subcutáneamente BM-MSCs y por medio de un marcador fluorescente las identificaron *in vivo* a los días 1, 3 y 7 después del tratamiento pero ya no las pudieron identificar a los 14 días (Zimmermann *et al.*, 2011). Es por ello que en nuestro modelo de defecto como ya se mencionó previamente, decidimos evaluar la efectividad de la terapia celular (ADSC) autóloga *in situ*, y para ello realizamos el seguimiento de las ADSCs implantadas con el marcaje *in vivo* de las células por medio de PKH26 que es un marcador de fluorescencia de la membrana celular, que no tiene efectos secundarios en el metabolismo de la célula, no muestra toxicidad, se sigue observando después de la división celular pero con una reducción de la fluorescencia y no suprime la proliferación celular (Li *et al.*, 2013).

La expresión de las células fue evidente a los 7 y 14 días, mientras que a los 21 días de tratamiento las células fueron pobremente detectadas mientras que su presencia fue nula en los grupos largos, 30 y 60 días. A pesar de que no pudimos determinar el rango de supervivencia de las ADSCs implantadas sabemos que por lo menos en un tiempo de 14 días, sobreviven y permanecen en la zona de lesión lo que nos indica su posible contribución en el proceso de regeneración. Después

de este tiempo estas células pudieron haber tomado la vía de diferenciación, perdido el marcaje, o sufrir apoptosis. Nuestros resultados son similares a otros estudios que reportan larga sobrevivencia celular *in situ*: Levi *et al.*, en 2011 rastrearon hASCs transfectadas con el gen luciferasa, implantadas en un defecto óseo en calota en ratón, lograron detectarlas en el sitio de lesión 4 semanas después del implante, considerando así, que éstas participan activamente en el proceso de regeneración de los defectos.

En un trabajo publicado sobre la utilidad de los modelos animales (Muschler *et al.*, 2010), se menciona que la histología es necesaria para caracterizar el patrón y la distribución de la celularidad (osteocitos, osteoblastos, células de revestimiento, y osteoclastos) en el tejido óseo mineralizado y/o para observar y analizar la cinética de la formación de hueso y mineralización del mismo, también es necesaria para caracterizar la naturaleza de los tejidos dentro de las regiones intertrabeculares, en donde se encuentra el tejido no mineralizado como: células hematopoyéticas, grasa, tejido fibroso, la vascularización, y el estado de cualquier respuesta inflamatoria; es por ello que sí bien en las mediciones realizadas: área de hueso nuevo, longitud y profundidad del defecto, en las que a pesar de que las diferencias no son tan marcadas entre los grupos de estudio, sí aportan evidencia de que la terapia celular aplicada tuvo mejores resultados; es por ellos que nosotros consideramos que la evidencia histológica es elemental en el análisis de la eficacia de la terapia celular. Así se demostró en nuestros resultados, en donde la capacidad de regeneración en términos de celularidad y organización del tejido en nuestros grupos ADSC7d, ADSC14d y ADSC21d fue mejor que en los grupos control. Por esta razón, (aunque en la presente tesis nos vimos limitados por el tiempo y el presupuesto, así como la disponibilidad de especímenes de estudio), se realizarán pruebas como inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* con el objetivo de poder demostrar claramente el potencial regenerativo de las ADSC.

Algunos autores como mencionan que una de las limitaciones de la Ingeniería de Tejidos es la falta de vascularización adecuada, así como estructura oportuna que permita la oxigenación, nutrición, y la eliminación de residuos de las células

(Shanbhag *et al.*, 2016); histológicamente hemos podido observar la presencia abundante de vascularización en el área del defecto, principalmente en los grupos ADSC14d y ADSC21d que son los tiempos en que se observa que el tejido óseo nuevo está en proceso de aposición y fue evidente en comparación con los grupos controles, en cambio en los grupos ADSC30d y ADSC60d que es cuando se observó la maduración del hueso nuevo, este proceso de vascularización disminuyó, quedando solamente el tejido óseo solo con algunos vasos y numerosos canales de Havers en ambos grupos. Estas evidencias nos indican que un factor importante para el proceso de regeneración fue el evento de vascularización que además, de las funciones mencionadas arriba, contribuyó al acarreamiento de células progenitoras y/o troncales y otros tipos celulares propios, esenciales en el proceso de regeneración de tejidos (Uccelli *et al.*, 2008). Este evento pudo ser potenciado precisamente por acción de las ADSCs implantadas, esta aseveración es soportada por varios autores: en un estudio demostraron la secreción *in vitro* de altos niveles de VEGF, HGF y TGF- β por las ASCs, además probaron que el número de células endoteliales cultivadas *in vitro* en un medio acondicionado de ASCs fue significativamente alto (Rehman *et al.*, 2004). También, otro estudio demostró la expresión por parte de las ASCs de proteínas involucradas en mecanismos de regeneración de tejidos, angiogénesis, proliferación celular y supresión de la inflamación, como MCP-1, MCP-3 y RANTES que recluyen BM-MSCs endógenas, además de IL-3 y IL-6 que recluyen células endoteliales y células progenitoras endoteliales y promueven la diferenciación osteogénica de MSCs, potenciando así la actividad osteogénica (Ando, 2014).

La respuesta fisiológica a la lesión de tejido se puede dividir en tres fases: inflamatoria, reparativa y remodelación (Wang *et al.*, 2014). En el estado inflamatorio hay concentraciones de citoquinas y células del sistema inmune que combaten la infección y disminuyen la respuesta reparadora y remodelación, que permite la curación de heridas. La plasticidad de la inmunomodulación mediada por las MSC en respuesta a las fluctuaciones en los niveles de inflamación promueve la regeneración, ya que en presencia de una inflamación fuerte las MSC

pueden hacerse inmunosupresoras y paradójicamente, ante la inflamación débil pueden mejorar la respuesta inmune, motivo por el que nosotros suponemos que entre nuestros hallazgos histológicos había diferencias entre el grupo control y en el que ese implantaron las ADSC, siendo este último donde se observó menos presencia de células de tipo inflamatorio, estas diferencias fueron sobre todo evidentes en el tiempo de estudio a 7 días.

Otra propiedad que presentan las MSCs y que las hace candidatas para su uso en la Medicina regenerativa y la Ingeniería de tejidos, es la secreción de moléculas como: factores de crecimiento, citosinas y quimiocinas que en los últimos años se han investigado y que se cree que es su rol más importante para la regeneración de tejidos (Meirelles *et al.*, 2009). Que forma parte del mecanismo de acción que ejercen estas células para regenerar un tejido dañado, y aunque no se sabe mucho, autores han propuesto un mecanismo de acción parácrino. Cuando las células se exponen a un estrés severo como la falta de alimento o hipoxia activan vías de supervivencia incrementando significativamente la secreción factores para contrarrestar estas condiciones (Lee SH, 2010). En estudios anteriores se han identificado BMPs, PDGF, TGF- β , IGF, VEGF, ECGF, FGF y EGF, en el medio condicionado de ADSCs y se sabe que actúan por mecanismos parácrinos para promover la osteogénesis, regulando respuestas celulares como: supervivencia, migración y expresión génica (Linero & Chaparro, 2014). Ando y colaboradores demostraron que un medio condicionado (CM) de MSCs presenta una actividad osteogénica similar que MSCs trasplantadas en un modelo de distracción osteogénica promoviendo el reclutamiento de BM-MSCs, células endoteliales, progenitores endoteliales y la formación de vasos sanguíneos maduros (Ando, 2014).

9 CONCLUSIONES

Obtuvimos una población celular con características de MSCs, que presento adherencia a la superficie de cultivo, alta capacidad proliferativa y de renovación, capacidad de diferenciación a la línea osteogénica, marcaje positivo a los marcadores: CD105, CD73, CD90, Vimentina, OCT4, así como un alto rendimiento en la obtención a partir de 1 gramo de grasa.

En la evaluación *post mortem* se observó una mejora en la disminución del tamaño de defecto en los grupos ADSC14 y ADSC21 con respecto a los grupos controles

En cuanto al seguimiento de las ADSCs implantadas, demostramos que las células sobreviven y permanecen en el sitio de lesión hasta el día 14.

La evaluación histológica evidenció la presencia de vascularización aumentada en los grupos ADSC14d y ADSC21d, sobre los grupos controles, esto es un elemento fundamental para el proceso de regeneración y se demostró la presencia de tipos celulares y tejido con características de hueso evidentes.

Los resultados de dispersión mediante la prueba de Pearson observaron una correlación con tendencia al aumento de hueso nuevo, de los grupos experimentales sobre los grupos control.

Evaluamos el proceso de regeneración ósea en un defecto crítico mandibular en rata tratado con ADSCs autólogas y observamos que hay una mejora en este proceso desde el tiempo de estudio de 7 días hasta el tiempo de 21 días, en los tiempos de 30 días y 60 días es difícil distinguir el diferencias entre el grupo control y el experimental, sin embargo, el grosor final del tejido a 60 días en el grupo ADSC es superior en comparación con el grupo Control.

10 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este estudio son prometedores para la regeneración ósea, es por ello que consideramos realizar una evaluación más profunda.

En el caso de los cultivos celulares, obtener una población de ADSCs purificada por el método de *cell sorting*.

Para la terapia celular realizar una evaluación histológica más exhaustiva como la aplicación de técnicas inmunoquímicas como: inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y Western blot para la detección de moléculas implicadas en la formación ósea. Además es importante evaluar la calidad del hueso regenerado por tomografía computarizada.

11 BIBLIOGRAFIA.

References

- Agata, K. (2003). Regeneration and gene regulation in planarians. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(5), 492-496. doi:S0959437X03001205 [pii]
- Akiyama, K., Chen, C., Gronthos, S., & Shi, S. (2012). Lineage differentiation of mesenchymal stem cells from dental pulp, apical papilla, and periodontal ligament. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 887, 111-121. doi:10.1007/978-1-61779-860-3_11 [doi]
- Ando, Y., Matsubara, K., Ishikawa, J., Fujio, M., Shohara, R., Hibi, H., . . . Yamamoto, A. (2014). Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone*, 61, 82-90. doi:10.1016/j.bone.2013.12.029 [doi]
- Ashjian, P. H., Elbarbary, A. S., Edmonds, B., DeUgarte, D., Zhu, M., Zuk, P. A., . . . Hedrick, M. H. (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 111(6), 1922-1931. doi:10.1097/01.PRS.0000055043.62589.05 [doi]
- Bajek, A., Gurtowska, N., Olkowska, J., Kazmierski, L., Maj, M., & Drewa, T. (2016). Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 64(6), 443-454. doi:10.1007/s00005-016-0394-x [doi]
- Bliley, J. M., Satish, L., McLaughlin, M. M., Kling, R. E., Day, J. R., Grahovac, T. L., . . . Rubin, J. P. (2015). Imaging the stromal vascular fraction during soft-tissue reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 136(6), 1205-1215. doi:10.1097/PRS.0000000000001815 [doi]
- Boiani, M., & Scholer, H. R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, 6(11), 872-884. doi:nrm1744 [pii]
- Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S., & Baer, P. (2005). Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(1), 142-150. doi:S0006-291X(05)00418-3 [pii]
- Caplan, A. I. (2005). Review: Mesenchymal stem cells: Cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Engineering*, 11(7-8), 1198-1211. doi:10.1089/ten.2005.11.1198 [doi]
- Cinti, S. (2001). The adipose organ: Morphological perspectives of adipose tissues. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), 319-328. doi:S0029665101000350 [pii]
- Colnot, C. (2011). Cell sources for bone tissue engineering: Insights from basic science. *Tissue Engineering.Part B, Reviews*, 17(6), 449-457. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0243 [doi]
- Cowan, C. M., Shi, Y. Y., Aalami, O. O., Chou, Y. F., Mari, C., Thomas, R., . . . Longaker, M. T. (2004). Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology*, 22(5), 560-567. doi:10.1038/nbt958 [doi]
- Cuthbert, R. J., Giannoudis, P. V., Wang, X. N., Nicholson, L., Pawson, D., Lubenko, A., . . . Jones, E. (2015). Examining the feasibility of clinical grade CD271+ enrichment of mesenchymal stromal cells for bone regeneration. *PloS One*, 10(3), e0117855. doi:10.1371/journal.pone.0117855 [doi]

- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 11), 2204-2213. doi:jcs.02932 [pii]
- Davis, T. A., Anam, K., Lazdun, Y., Gimble, J. M., & Elster, E. A. (2014). Adipose-derived stromal cells promote allograft tolerance induction. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(12), 1444-1450. doi:10.5966/sctm.2014-0131 [doi]
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:Q2183N8UT042W62H [pii]
- Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M., & Kumar, S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: Evidence and potential applications. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(9), 984-992. doi:10.1096/fj.02-0634rev [doi]
- El-Kehdy, H., Pourcher, G., Zhang, W., Hamidouche, Z., Goulinet-Mainot, S., Sokal, E., . . . Dubart-Kupperschmitt, A. (2016). Hepatocytic differentiation potential of human fetal liver mesenchymal stem cells: In vitro and in vivo evaluation. *Stem Cells International*, 2016, 6323486. doi:10.1155/2016/6323486 [doi]
- Estrada Flores Elvira y Uribe Aranzábal María del carmen (Ed.). (2002). *Atlas de histología de vertebrados* (Primera ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., & Hedrick, M. H. (2006). Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 24(4), 150-154. doi:S0167-7799(06)00028-X [pii]
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A., & Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2), 83-92.
- Geraudie, J., & Ferretti, P. (1998). Gene expression during amphibian limb regeneration. *International Review of Cytology*, 180, 1-50.
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249-1260. doi:100/9/1249 [pii]
- Gómez de Ferraris, María Elsa y Campos Muñoz Antonio (Ed.). (2009). *Histología. embriología en ingeniería tisular bucodental*. (Tercera edición ed.). Buenos Aires: Panamericana.
- Greco, S. J., Liu, K., & Rameshwar, P. (2007). Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(12), 3143-3154. doi:2007-0351 [pii]
- Gu, Q., Gu, Y., Shi, Q., & Yang, H. (2016). Hypoxia promotes osteogenesis of human placental-derived mesenchymal stem cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 239(4), 287-296. doi:10.1620/tjem.239.287 [doi]
- Guneta, V., Tan, N. S., Chan, S. K., Tanavde, V., Lim, T. C., Wong, T. C., & Choong, C. (2016). Comparative study of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in

- similar microenvironmental conditions. *Experimental Cell Research*, 348(2), 155-164. doi:S0014-4827(16)30291-9 [pii]
- He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 377-406. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113248 [doi]
- Jin, H. J., Bae, Y. K., Kim, M., Kwon, S. J., Jeon, H. B., Choi, S. J., . . . Chang, J. W. (2013). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17986-18001. doi:10.3390/ijms140917986 [doi]
- Junqueira Luis C. y Carneiro José (Ed.). (2006). *Histología básica* (sexta edición ed.). Barcelona: Masson.
- Keibl, C., Fugl, A., Zanoni, G., Tangl, S., Wolbank, S., Redl, H., & van Griensven, M. (2011). Human adipose derived stem cells reduce callus volume upon BMP-2 administration in bone regeneration. *Injury*, 42(8), 814-820. doi:10.1016/j.injury.2011.03.007 [doi]
- Kumar, B. P., Venkatesh, V., Kumar, K. A., Yadav, B. Y., & Mohan, S. R. (2016). Mandibular reconstruction: Overview. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 15(4), 425-441. doi:10.1007/s12663-015-0766-5 [doi]
- Levi, B., James, A. W., Nelson, E. R., Hu, S., Sun, N., Peng, M., . . . Longaker, M. T. (2011). Studies in adipose-derived stromal cells: Migration and participation in repair of cranial injury after systemic injection. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 127(3), 1130-1140. doi:10.1097/PRS.0b013e3182043712 [doi]
- Levi, B., James, A. W., Nelson, E. R., Vistnes, D., Wu, B., Lee, M., . . . Longaker, M. T. (2010). Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One*, 5(6), e11177. doi:10.1371/journal.pone.0011177 [doi]
- Li, B., Zheng, Y. W., Sano, Y., & Taniguchi, H. (2011). Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation. *PLoS One*, 6(2), e17092. doi:10.1371/journal.pone.0017092 [doi]
- Li, J., Zhang, S., & Amaya, E. (2016). The cellular and molecular mechanisms of tissue repair and regeneration as revealed by studies in xenopus. *Regeneration (Oxford, England)*, 3(4), 198-208. doi:10.1002/reg2.69 [doi]
- Li, P., Zhang, R., Sun, H., Chen, L., Liu, F., Yao, C., . . . Jiang, X. (2013). PKH26 can transfer to host cells in vitro and vivo. *Stem Cells and Development*, 22(2), 340-344. doi:10.1089/scd.2012.0357 [doi]
- Licéaga-Reyes, R., Montoya-Perez, L., & Segovia-Hernandez, S. (2010). Incidencia de fracturas maxilofaciales en pacientes del servicio de cirugía maxilofacial del hospital Juárez de México en los años 2007-2008. *Revista Odontológica Latinoamericana*, 2(1), 1-3.
- Lindroos, B., Suuronen, R., & Miettinen, S. (2011). The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews*, 7(2), 269-291. doi:10.1007/s12015-010-9193-7 [doi]

- Linero, I., & Chaparro, O. (2014). Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PloS One*, 9(9), e107001. doi:10.1371/journal.pone.0107001 [doi]
- Lozito, T. P., & Tuan, R. S. (2015). Lizard tail regeneration: Regulation of two distinct cartilage regions by indian hedgehog. *Developmental Biology*, 399(2), 249-262. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.12.036>
- Luna, A. C., Madeira, M. E., Conceição, T. O., Moreira, J. A., Laiso, R. A., & Maria, D. A. (2014). Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. *BMC Research Notes*, 7(1), 1.
- Maleki, M., Ghanbarvand, F., Reza Behvarz, M., Ejtemaei, M., & Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *International Journal of Stem Cells*, 7(2), 118-126. doi:10.15283/ijsc.2014.7.2.118 [doi]
- Martella, E., Bellotti, C., Dozza, B., Perrone, S., Donati, D., & Lucarelli, E. (2014). Secreted adiponectin as a marker to evaluate in vitro the adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16(11), 1476-1485. doi:10.1016/j.jcyt.2014.05.005 [doi]
- Meijer, G. J., de Bruijn, J. D., Koole, R., & van Blitterswijk, C. A. (2008). Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*, 29(21), 3053-3061. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.03.012 [doi]
- Meirelles Lda, S., Fontes, A. M., Covas, D. T., & Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5-6), 419-427. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.002 [doi]
- Meza-Zepeda, L. A., Noer, A., Dahl, J. A., Micci, F., Myklebost, O., & Collas, P. (2008). High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(2), 553-563. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00146.x [doi]
- Michael H. Ross, Wojciech Pawlina (Ed.). (2013). *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular* (6th ed.) Editorial Medica Panamericana Sa de, 2013.
- Michalopoulos, G. K. (2013). Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 485-513. doi:10.1002/cphy.c120014 [doi]
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., & Bouloumie, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, 110(3), 349-355. doi:10.1161/01.CIR.0000135466.16823.D0 [doi]
- Molina, E. R., Smith, B. T., Shah, S. R., Shin, H., & Mikos, A. G. (2015). Immunomodulatory properties of stem cells and bioactive molecules for tissue engineering. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 219, 107-118. doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.038 [doi]
- Muschler, G. F., Raut, V. P., Patterson, T. E., Wenke, J. C., & Hollinger, J. O. (2010). The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(1), 123-145. doi:10.1089/ten.TEB.2009.0658 [doi]

- Nagata, H., Ii, M., Kohbayashi, E., Hoshiga, M., Hanafusa, T., & Asahi, M. (2016). Cardiac adipose-derived stem cells exhibit high differentiation potential to cardiovascular cells in C57BL/6 mice. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(2), 141-151. doi:10.5966/sctm.2015-0083 [doi]
- Niemeyer, P., Fechner, K., Milz, S., Richter, W., Suedkamp, N. P., Mehlhorn, A. T., . . . Kasten, P. (2010). Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*, 31(13), 3572-3579. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.085 [doi]
- Nkenke, E., Radespiel-Troger, M., Wiltschko, J., Schultze-Mosgau, S., Winkler, G., & Neukam, F. W. (2002). Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: A prospective study. *Clinical Oral Implants Research*, 13(5), 514-521. doi:10.1034/j.1600-0501.2002.130511.x [pii]
- Organización Mundial de la Salud. (2015). **Informe sobre la situación mundial de la seguridad vial 2015**. (No. 2015). doi:Francia
- Parker, A. M., & Katz, A. J. (2006). Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 6(6), 567-578. doi:10.1517/14712598.6.6.567 [doi]
- Ra, J. C., Shin, I. S., Kim, S. H., Kang, S. K., Kang, B. C., Lee, H. Y., . . . Kwon, E. (2011). Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells and Development*, 20(8), 1297-1308. doi:10.1089/scd.2010.0466 [doi]
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108. doi:10.1074/jbc.R109.041087 [doi]
- Ramirez Porras, M. E. (2015). *Validacion de defecto critico en hueso mandibular de rata en la cepa wistar*
- Rege, T. A., & Hagood, J. S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), 1045-1054. doi:10.1096/faseb.2006.20.8.1045 [pii]
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., . . . March, K. L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109(10), 1292-1298. doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1 [doi]
- Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., . . . Ancans, J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews*, 5(4), 378-386. doi:10.1007/s12015-009-9094-9 [doi]
- Rinella, L., Marano, F., Berta, L., Bosco, O., Fraccalvieri, M., Fortunati, N., . . . Catalano, M. G. (2016). Extracorporeal shock waves modulate myofibroblast differentiation of adipose-derived stem cells. *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 24(2), 275-286. doi:10.1111/wrr.12410 [doi]
- Rosset, P., Deschaseaux, F., & Layrolle, P. (2014). Cell therapy for bone repair. *Orthopaedics & Traumatology, Surgery & Research : OTSR*, 100(1 Suppl), S107-12. doi:10.1016/j.otsr.2013.11.010 [doi]

- Rucci, N. (2008). Molecular biology of bone remodelling. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism : The Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 5(1), 49-56.
- Shanbhag, S., Pandis, N., Mustafa, K., Nyengaard, J. R., & Stavropoulos, A. (2016). Cell cotransplantation strategies for vascularized craniofacial bone tissue engineering: A systematic review and meta-analysis of preclinical in vivo studies. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, doi:10.1089/ten.TEB.2016.0283 [doi]
- Sheng, G. (2015). The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *BMC Developmental Biology*, 15, 44-015-0094-5. doi:10.1186/s12861-015-0094-5 [doi]
- Slack, J. M. (2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5457), 1431-1433. doi:8289 [pii]
- Sobotta, W. (Ed.). (2009). *Histología* (2nd ed.) Editorial médica Panamericana S.A.
- Somal, A., Bhat, I. A., B, I., Pandey, S., Panda, B. S., Thakur, N., . . . Sharma, G. T. (2016). A comparative study of growth kinetics, in vitro differentiation potential and molecular characterization of fetal adnexa derived caprine mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 11(6), e0156821. doi:10.1371/journal.pone.0156821 [doi]
- Streckbein, P., Jackel, S., Malik, C. Y., Obert, M., Kahling, C., Wilbrand, J. F., . . . Howaldt, H. P. (2013). Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery : Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 41(6), 496-503. doi:10.1016/j.jcms.2013.04.002 [doi]
- Stubbendorff, M., Deuse, T., Hua, X., Phan, T. T., Bieback, K., Atkinson, K., . . . Schrepfer, S. (2013). Immunological properties of extraembryonic human mesenchymal stromal cells derived from gestational tissue. *Stem Cells and Development*, 22(19), 2619-2629. doi:10.1089/scd.2013.0043 [doi]
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. doi:S0092-8674(06)00976-7 [pii]
- Trejo Iriarte, C. G. (2010). *Validación de defecto crítico en hueso mandibular de rata en la cepa wistar*
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726-736. doi:10.1038/nri2395 [doi]
- Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5), 639-648. doi:S0092867404002089 [pii]
- Wang, S., & Yang, X. (2016). Inter-organ regulation of adipose tissue browning. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, doi:10.1007/s00018-016-2420-x [doi]
- Wang, Y., Chen, X., Cao, W., & Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, 15(11), 1009-1016. doi:10.1038/ni.3002 [doi]

- Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., & Ivanova, N. (2012). Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 10(4), 440-454. doi:10.1016/j.stem.2012.02.016 [doi]
- Zhao, Z., Yu, H., Fan, C., Kong, Q., Liu, D., & Meng, L. (2016). Differentiate into urothelium and smooth muscle cells from adipose tissue-derived stem cells for ureter reconstruction in a rabbit model. *American Journal of Translational Research*, 8(9), 3757-3768.
- Zigdon-Giladi, H., Rudich, U., Michaeli Geller, G., & Evron, A. (2015). Recent advances in bone regeneration using adult stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 7(3), 630-640. doi:10.4252/wjsc.v7.i3.630 [doi]
- Zimmerlin, L., Donnenberg, V. S., Pfeifer, M. E., Meyer, E. M., Peault, B., Rubin, J. P., & Donnenberg, A. D. (2010). Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry.Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(1), 22-30. doi:10.1002/cyto.a.20813 [doi]
- Zimmermann, C. E., Gierloff, M., Hedderich, J., Acil, Y., Wiltfang, J., & Terheyden, H. (2011). Survival of transplanted rat bone marrow-derived osteogenic stem cells in vivo. *Tissue Engineering.Part A*, 17(7-8), 1147-1156. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0577 [doi]
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., . . . Hedrick, M. H. (2002a). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105 [doi]
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., . . . Hedrick, M. H. (2002b). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., . . . Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211-228. doi:10.1089/107632701300062859 [doi]

12 ANEXOS.

Medios de cultivo utilizados

Nombre	Marca
Antibiótico	Biowest
Colagenasa	Sigma Aldrich
DMEM High Glucose	Gibco
FBS	Biowest
PBS	Sigma Aldrich
Pkh26	Sigma Aldrich
Tripsina 0.25% EDTA	Biowest

Reactivos utilizados

Nombre	Marca
Alcohol etílico	--
Acetato-n-butilo	--
Ascorbato-2-fosfato	Sigma Aldrich
Azul de tripano	Biowest
B-glicerolfosfato	Sigma Aldrich
Dexametasona	Sigma Aldrich
DMSO	--
Eosina	--
Hematoxilina	--
MTT	Sigma Aldrich
Osteosoft	Merck Millipore
Paraformaldehido	Sigma Aldrich
Parafina	Sigma Aldrich
Polylisina	Sigma Aldrich

Dispositivos utilizados

Dispositivo	Marca
Balanza granataria	--
Centrífuga	HERMLE
Campana de flujo laminar	NUAIRE
Equipo radiográfico	--
Espectrofotómetro Epoch	Biotek
Incubadora	NUAIRE
Micromotor	Strong 210
Microscopio de fluorescencia	AXIO LAB de ZEISS®
Microscopio electrónico de barrido	AXIO LAB de ZEISS®
Microscopio invertido	AXIO LAB de ZEISS®
Microscopio óptico	AXIO LAB de ZEISS®
Microtomo	Leica