



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA
DE ANDAMIOS
PARA LA REPARACIÓN ÓSEA**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
CAROLINA ÁLVAREZ ANDRADE**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AÑO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: HOMERO HERNÁNDEZ MONTES

VOCAL: Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

SECRETARIO: Profesor: NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES

1er. SUPLENTE: Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

2° SUPLENTE: Profesor: LAURA CARMONA SALAZAR

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
EN MATERIALES, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA: NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): CAROLINA ÁLVAREZ ANDRADE

(nombre (s) y firma (s))

AGRADECIMIENTOS

Técnicos

DGAPA

- PAPIIT IN 224316
- PAPIIME PE 211115

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Índice de gráficas	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.1.1. Generales	3
1.1.2. Específicos	3
1.2. HIPÓTESIS	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1. EL HUESO	6
2.1.1. Células del hueso	8
2.1.1.1. Osteoblastos	8
2.1.1.2. Osteocitos	9
2.1.1.3. Células de revestimiento	9
2.1.1.4. Osteoclastos	9
2.1.2. Reparación ósea	10
2.2. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (CTM)	11
2.2.1. Inductores y genes para la diferenciación de las CTM	13
2.3. ANDAMIOS A BASE DE POLIURETANOS PARA LA REPARACIÓN	13

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	16
3.1. OBTENCIÓN DE CTMh	18
3.1.1. Aislamiento de CTMh de membrana amniótica de placenta	18
3.1.2. Multipotencia	23
3.1.3. Clonogenicidad	25
3.1.4. Citometría de flujo	26
3.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOCONDUCTOR	26
3.2.1. Proliferación celular	26
3.2.2. Adhesión celular	27
3.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOINDUCTOR	28
3.3.1. Extracción de RNA	28
3.3.1.1. Cuantificación de RNA	29
3.3.2. Retrotranscripción	30
3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
3.3.4. Electroforesis	33
4. RESULTADOS	35
4.1. OBTENCIÓN DE CTMh	36
4.1.1. Multipotencia	36
4.1.2. Clonogenicidad	37
4.1.3. Citometría de flujo	38
4.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOCONDUCTOR	39
4.2.1. Proliferación celular	39
4.2.2. Adhesión celular	40
4.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOINDUCTOR	42

5. DISCUSIÓN	44
5.1. OBTENCIÓN DE CTMh	45
5.1.1. Multipotencia	45
5.1.2. Clonogenicidad	45
5.1.3. Citometría de flujo	45
5.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOCONDUCTOR	47
5.2.1. Proliferación celular	47
5.2.2. Adhesión celular	47
5.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOINDUCTOR	48
5.3.1. Expresión de marcadores osteogénicos	48
6. CONCLUSIONES	49
6.1. OBTENCIÓN DE CTMh	50
6.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOCONDUCTOR	50
6.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOINDUCTOR	51
7. BIBLIOGRAFÍA	52
8. ANEXOS	63
8.1. CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	64
8.2. CARTA DEL COMITÉ DE ÉTICA	67

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Composición de los huesos largos.	7
Figura 2. Etapas de reparación de fractura.	11
Figura 3. Grupos uretano, urea y amida.	14
Figura 4. Placenta humana obtenida por cesárea.	18
Figura 5. Digestión enzimática con tripsina.	20
Figura 6. CTMh al día 3 de cultivo celular.	22
Figura 7. Procesamiento de muestras para MEB.	27
Figura 8. Espectrofotómetro de ácidos nucleicos.	30
Figura 9. Retrotranscripción de RNA.	31
Figura 10. Esquema de las condiciones para la PCR.	32
Figura 11. Preparación de termociclador para PCR.	33
Figura 12. Equipo de electroforesis con muestra en proceso.	34
Figura 13. Proceso para revelar geles de electroforesis.	34
Figura 14. Células teñidas específicamente vistas en microscopio óptico a 40x.	36
Figura 15. Inmunofenotipo de las células.	38
Figura 16. Micrografías electrónicas de los andamios a base de PU.	41
Figura 17. Electroforesis reveladora de PCR de GAPDH.	42
Figura 18. Electroforesis reveladora de PCR para el marcador osteogénico CBFA-1.	43

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Medios inductores para multipotencia.	23
Tabla 2. Primers empleados en la PCR.	31

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	PÁGINA
Gráfica 1. Clonogenicidad (UFC vs. Concentración celular).	37
Gráfica 2. Proliferación celular (Absorbancia vs. Tiempo).	39

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitros
µM	Micromolar
A	Adenina
A1	Andamio 1
A2	Andamio 2
A3	Andamio 3
A4	Andamio 4
C	Citocina
CBFA-1	Factor de unión del núcleo alfa 1
CD	Cluster de diferenciación
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
Cél	Células
cm	Centímetro
CTA	Células troncales adultas
CTE	Células troncales embrionarias
CTM	Células troncales mesenquimales
CTMh	Células troncales mesenquimales humanas
Ctrl	Control
Cy5	Colorante de cianina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAsas	Desoxiribonucleasa
dNTP	Desoxinucleótidos
DTT	Ditiotreitol

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Exp	Experimental
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	Dispersión frontal
G	Guanina
x g	Gravedad
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IOs	Compuestos osteoinductivos
kV	Kilovoltios
M	Molar
MEB	Microscopio electrónico de barrido
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
Oligo dT	Primer de nucleótidos de desoxi-Timidina
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PM	Peso molecular
PU	Poliuretanos
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsas	Ribonucleasa

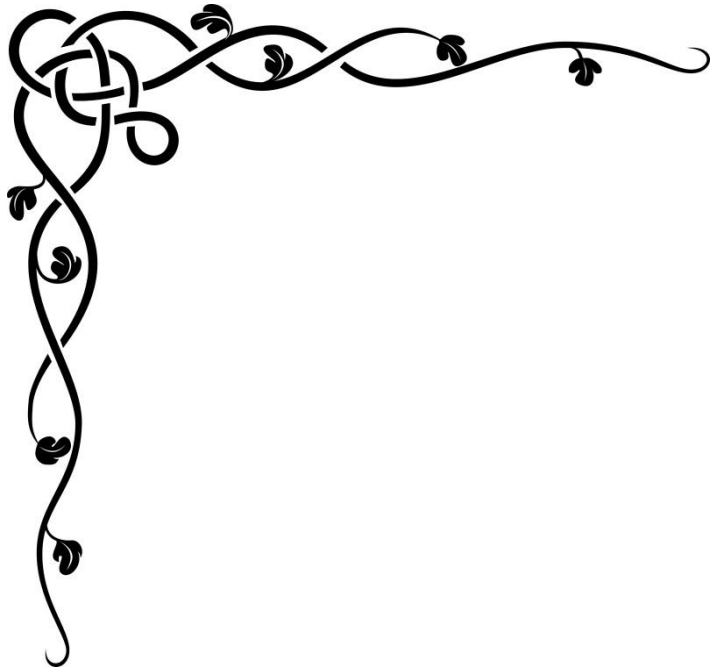
seg	Segundos
SFB	Suero fetal bovino
SS	Dispersión lateral
T	Timina
TAE	Amortiguador de Tris, acetato y EDTA
Taq polimerasa	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
V	Voltios

RESUMEN

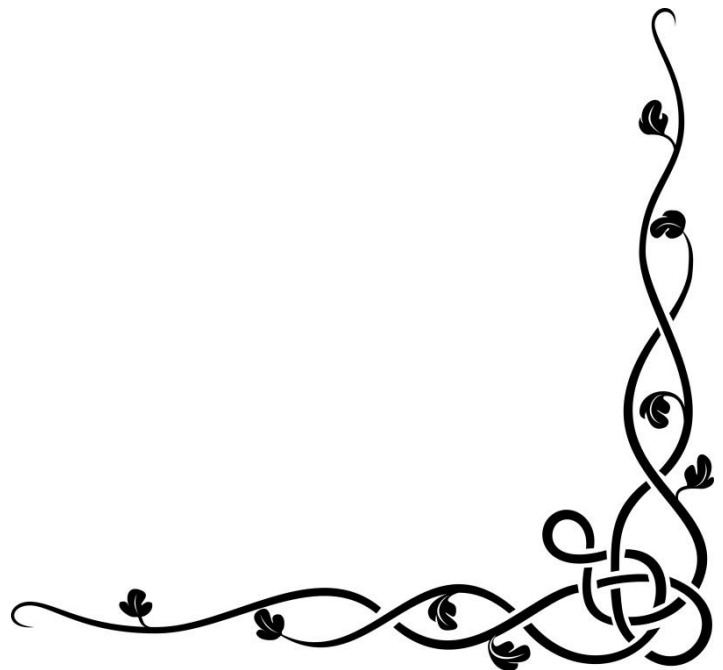
Existe una gran cantidad de personas hospitalizadas, cuya patología se relaciona con lesiones y/o pérdidas óseas, razón por la cual se han diseñado implantes hechos de materiales naturales y sintéticos para reparar dichas lesiones. Estos materiales, además de ser biocompatibles y no provocar citotoxicidad ni genotoxicidad, deben tener la capacidad de promover la migración, adhesión y proliferación de células de linaje osteoblástico para procurar el mantenimiento y remodelación ósea (osteoconducción), además de poseer la capacidad de promover la diferenciación de células troncales a células de linaje osteoblástico favoreciendo la formación de hueso nuevo (osteoinducción). El objetivo de este estudio fue aislar células troncales mesenquimales humanas (CTMh) de membrana amniótica de placenta, y determinar el potencial osteoconductor y osteoinductor de andamios sintéticos compuestos por poliuretanos (PU) y compuestos osteoinductivos (IOs).

Se realizó el aislamiento enzimático de las CTMh, así como la evaluación de su potencial de diferenciación, clonogenicidad e inmunofenotipificación. Así mismo, se realizaron los ensayos de proliferación por métodos colorimétricos, adhesión celular por microscopía electrónica de barrido, y potencial osteogénico por detección de genes en PCR, para los cultivos control (sin andamios) y experimentales (con andamios). Se

logró aislar correctamente las CTMh. También se demostró que los andamios promovieron la proliferación celular en comparación con el control negativo (sin andamio) y uno de los andamios promovió la adhesión celular a su superficie, mientras que no se detectó la activación de genes clave en la diferenciación osteoblástica, por lo que se concluye que los andamios hechos a base de poliuretanos participan en el proceso de reparación ósea a través del mecanismo de osteoconducción.



1. INTRODUCCIÓN



La reparación de lesiones y/o pérdidas óseas provocadas por traumatismos, tumores o deformidades congénitas sigue siendo un desafío para los cirujanos. Tan sólo en los Estados Unidos de América las lesiones óseas afectan a siete millones de personas cada año, lo que representa un problema de salud importante [1].

Debido a esto se han diseñado y empleado materiales de origen natural o sintético para la reparación de lesiones óseas, denominados biomateriales. Los biomateriales son aquellos materiales utilizados para evaluar, tratar, corregir o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano [2]. Además de mantener el buen funcionamiento del cuerpo humano, los biomateriales deben ser biocompatibles y no provocar citotoxicidad ni genotoxicidad. En el caso de las lesiones óseas, los materiales deben ser capaces de promover la migración, adhesión y proliferación de células osteoblásticas para procurar el mantenimiento y remodelación ósea (osteoconducción), además de poseer la capacidad de promover la diferenciación de células troncales a células de linaje osteoblástico favoreciendo la formación de hueso nuevo (osteoinducción).

Por esto, es importante desarrollar biomateriales con propiedades osteoconductoras y osteoinductoras que imiten la anatomía y fisiología

del hueso para contribuir a mejorar y restablecer la función del tejido dañado.

Los poliuretanos (PU) representan una prometedora clase de polímeros para la reconstrucción del tejido óseo debido a su amplio rango de propiedades mecánicas, degradación controlada y biotolerancia [3,4]. En este sentido, resulta indispensable la evaluación biológica de estos polímeros en aras de proyectarlos como una opción terapéutica en la reparación ósea guiada.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. General

Aislar células troncales mesenquimales humanas (CTMh) y caracterizar las propiedades biológicas de andamios a base de PU diseñados para la reparación ósea en un sistema *in vitro*.

1.1.2. Específicos

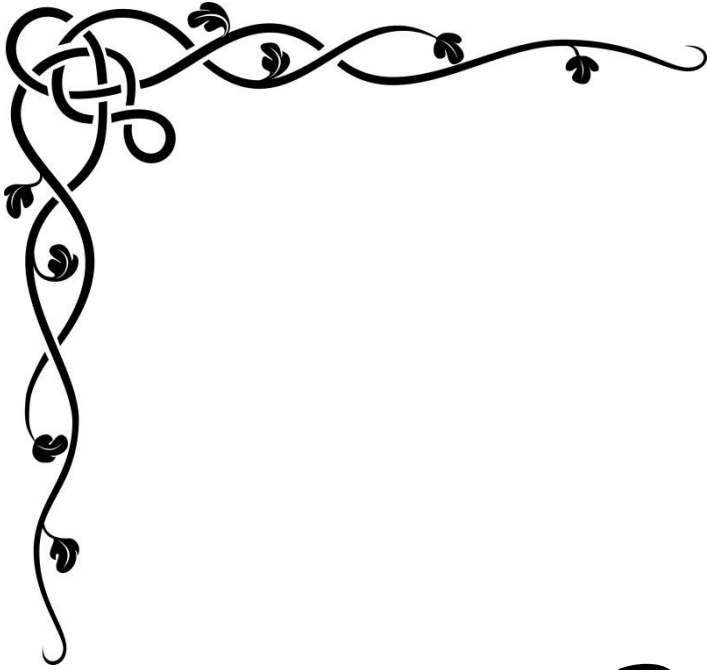
-Aislar células troncales mesenquimales humanas de membrana amniótica de placenta.

-Determinar el potencial osteoconductor y osteoinductor de andamios sintéticos a base de PU.

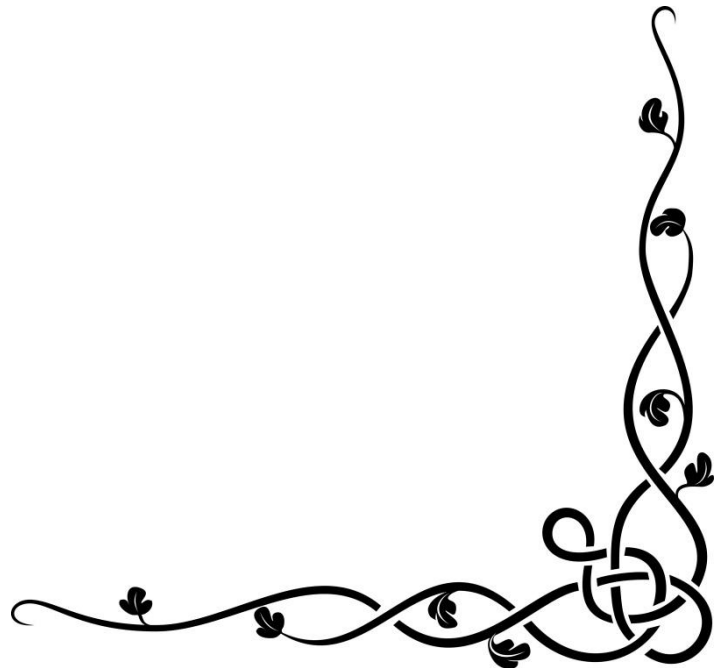
1.2. HIPÓTESIS

-Se logrará aislar CTMh de membrana amniótica de placenta humana.

-Los andamios sintéticos a base de PU y compuestos osteoinductores promoverán de manera eficiente la osteoconducción y osteoinducción en CTMh.



2. **ANTECEDENTES**



2.1. EL HUESO

El esqueleto humano adulto tiene un total de 213 huesos. A lo largo de la vida cada hueso se somete constantemente al modelamiento para adaptarse a las fuerzas biomecánicas cambiantes, así como a la remodelación para eliminar hueso viejo y con microlesiones, y reemplazarlo con hueso nuevo, mecánicamente más fuerte que ayude a preservar la resistencia ósea [5].

El esqueleto exhibe una gran variedad de funciones. Los huesos del esqueleto proporcionan soporte estructural para el resto del cuerpo, permiten el movimiento y la locomoción proporcionando palancas para los músculos, protegen los órganos internos vitales y proporcionan el mantenimiento de la homeostasis mineral, así como el equilibrio ácido-base, también sirven como un depósito de factores de crecimiento y citocinas, y proporcionan el entorno para la hematopoyesis dentro de los espacios medulares [6].

Los huesos largos se componen de un eje hueco, o diáfisis; una metáfisis acampanada y en forma de cono por debajo de las placas de crecimiento; y una epífisis redondeada por encima de las placas de crecimiento. La diáfisis está compuesta principalmente de hueso cortical denso, mientras que la metáfisis y epífisis están compuestas de hueso

en red trabecular rodeado por una cubierta relativamente delgada de hueso cortical denso (Figura 1).



Figura 1. Composición de los huesos largos. Se pueden apreciar las partes del hueso y la presencia de hueso esponjoso y hueso cortical.

El esqueleto humano adulto se compone de 80% de hueso cortical y 20% de hueso trabecular [7]. Los huesos presentan una distribución heterogénea en cuanto a la proporción y presencia de hueso cortical y trabecular.

El hueso se compone de 50 a 70% de minerales, de 20 a 40% de la matriz orgánica, de 5 a 10% de agua, y <3% de lípidos. El contenido mineral del hueso es principalmente hidroxapatita no estequiométrica

[Ca₁₀ (PO₄)₆ (OH)₂], con pequeñas cantidades de carbonato, magnesio y fosfato ácido [5].

Los minerales del hueso proporcionan rigidez mecánica y fuerza de soporte, mientras que la matriz orgánica proporciona elasticidad y flexibilidad.

2.1.1. Células del hueso

2.1.1.1. Osteoblastos

Los osteoblastos producen y secretan las proteínas que constituyen la matriz ósea [8]. La matriz se mineraliza posteriormente bajo el control de las mismas células. Un producto principal del osteoblasto que forma hueso es la colágena tipo I, además de otras proteínas que se incorporan en la matriz ósea, incluyendo osteocalcina y osteonectina. Otras proteínas derivadas de osteoblastos incluyen glicosaminoglicanos, proteínas menores tales como osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina, vitronectina y trombospondina que sirven como factores de unión que interactúan con integrinas. Además de ser las células que producen la matriz osteoide, los osteoblastos son esenciales para su mineralización, por el proceso de deposición de hidroxapatita [9, 10].

2.1.1.2. Osteocitos

Los osteocitos se caracterizan por su forma de estrella [11, 12] y son el tipo celular más abundante en el hueso. Se espacian regularmente a lo largo de la matriz mineralizada y se comunican entre sí y con las células en la superficie ósea a través de múltiples extensiones de su membrana plasmática que corren a lo largo del canalículo. Como consecuencia son capaces de detectar la necesidad de aumento o reducción ósea durante la adaptación funcional del esqueleto y la necesidad de reparación de microlesiones.

2.1.1.3. Células de revestimiento

La superficie del hueso que no se somete a remodelación está cubierta por una capa de 1-2 mm de matriz de colágena no mineralizada en la parte superior, de la cual hay una capa de células planas y alargadas. Estas células se llaman células de revestimiento y son descendientes de los osteoblastos [13].

2.1.1.4. Osteoclastos

Los osteoclastos son generalmente células multinucleadas grandes (50-100 μm de diámetro) con abundantes mitocondrias, numerosos

lisosomas y ribosomas libres. Su característica morfológica más notable es el borde ondulado, un sistema complejo de proyecciones en forma de dedos de la membrana, cuya función es mediar la reabsorción de la matriz ósea calcificada [14].

2.1.2. Reparación ósea

La reparación de fracturas por producción de callos se produce en cuatro fases (Figura 2) [15–19, 22]. Tras la lesión del sistema músculo-esquelético, la disrupción de los vasos sanguíneos conduce a la activación de la cascada de la coagulación y a la formación de un hematoma, que delimita el área de la fractura (Figura 2a). Las células inflamatorias, los fibroblastos y las células troncales se reclutan en el sitio y se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (angiogénesis). La respuesta inflamatoria se asocia con dolor, calor, hinchazón, y la liberación de varios factores de crecimiento y citocinas que tienen un papel importante en la reparación [15, 17, 19-21]. Inicialmente, el tejido de granulación se forma en los extremos de los huesos, siendo gradualmente reemplazado por fibrocartílago. Mientras tanto, el periostio sufre formación ósea directa (osificación intramembranosa) para crear un callo externo (Figura 2b). Posteriormente, el callo interno se mineraliza con hidroxapatita, para formar un callo de hueso compacto (Figura 2c). En la fase final de la

remodelación ósea, el callo es reemplazado por hueso laminar secundario; el tamaño del callo se reduce al de hueso preexistente en el sitio de daño, y el suministro vascular vuelve a un estado fisiológico (Figura 2d).

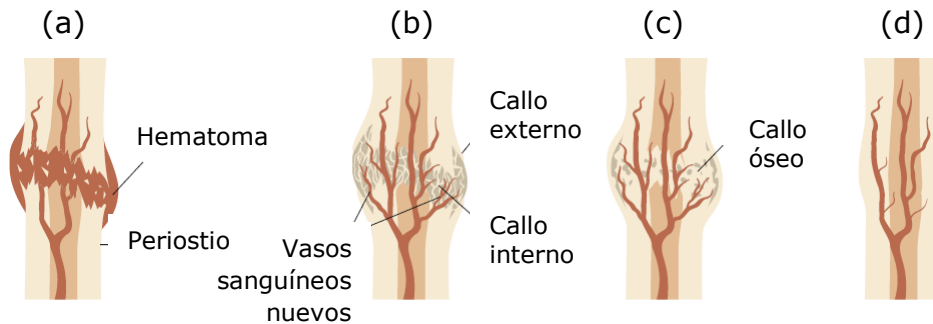


Figura 2. Etapas de reparación de fractura. (a) Formación de hematoma. (b) Formación de callo suave. (c) Formación de callo duro. (d) Remodelación del hueso.

2.2. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

Las células troncales tienen dos características: la capacidad de diferenciarse hacia diversos linajes celulares y la capacidad de auto-renovación [23]. Se han descrito dos tipos principales de células troncales, las células troncales embrionarias (CTE) y las células troncales adultas (CTA).

Dentro del linaje de las células troncales adultas, se encuentran las células troncales mesenquimales (CTM), son células estromales que poseen la capacidad de auto-renovación y también muestran una

diferenciación multilínea [24, 25]. Éstas se pueden aislar de una amplia variedad de tejidos, tales como el cordón umbilical, pólipos endometriales, flujo menstrual, médula ósea, tejido adiposo, entre otros [26, 27]. Esto se debe a la facilidad de su obtención y a la cantidad obtenida, lo que ha promovido que estas fuentes se proyecten como las más prácticas para aplicaciones experimentales y posibles aplicaciones clínicas.

Las CTM pueden diferenciarse en varios linajes del mesodermo, ectodermo y endodermo, tales como osteoblastos, adipocitos, condrocitos, miocitos, neuronas, células de los islotes y hepatocitos en condiciones específicas *in vitro* [28, 29]. La diferenciación también está regulada por los acontecimientos genéticos, que involucran factores de transcripción. En este sentido, la diferenciación a un fenotipo particular puede ser controlada por genes reguladores que pueden inducir la diferenciación de células progenitoras a un linaje específico [24]. Además de los factores de crecimiento y otros químicos de inducción, un microambiente diseñado con biomateriales, por ejemplo el Nukbone® [46], también puede proporcionar a las CTM las condiciones de proliferación y diferenciación apropiadas [30, 31].

2.2.1. Inductores y genes para la diferenciación de las CTM

En la diferenciación osteogénica una mezcla de dexametasona, β -glicerolfosfato, y ácido ascórbico ha sido ampliamente utilizada para la inducción osteoblástica, lo cual se demuestra por la acumulación de calcio y la actividad incrementada de la enzima fosfatasa alcalina [32]. Por otro lado, en la diferenciación adipogénica se utilizan para la inducción dexametasona, isobutilo-metilxantina e indometacina, lo que induce la formación de gotitas de lípidos que se observan con una tinción de rojo oleoso en las células [33, 34]. En la diferenciación condrogénica están involucrados los factores de crecimiento transformante β 1 y β 2 (TGF- β 2 y TGF- β 1) [35]. Adicionalmente el gen de factor de unión del núcleo alfa 1 (CBFA-1) juega un papel esencial en la osteogénesis, por lo que se ha denominado el gen maestro de la osteogénesis [36, 37].

2.3. ANDAMIOS A BASE DE POLIURETANOS PARA LA REPARACIÓN

El objetivo de la ingeniería tisular es ensamblar construcciones que proporcionen señales mecánicas, celulares y moleculares para restaurar, mantener o mejorar los tejidos u órganos dañados. En respuesta a esta demanda de tejidos, la ciencia aporta los andamios o scaffolds a base de

diversos materiales que biomimeten el tejido receptor. En este sentido, los poliuretanos (PU) se introdujeron como andamios potenciales para la reparación del hueso y el cartílago a finales de los años 90's. Desde entonces los PU se aplicaron como cementos óseos, rellenos inyectables, sistemas de suministro de fármacos, materiales de memoria de forma, entre otros [38, 39]. Las propiedades deseables de los PU se pueden adaptar cambiando la composición química, la proporción de materias primas, parámetros de síntesis o la tecnología empleada para su diseño y fabricación. Por lo tanto los PU se pueden obtener como estables o biodegradables, hidrófobos o hidrófilos, termoplásticos o termoendurecibles, que conducen a una gama muy amplia de productos como espumas, revestimientos, fibras o películas [40, 41].

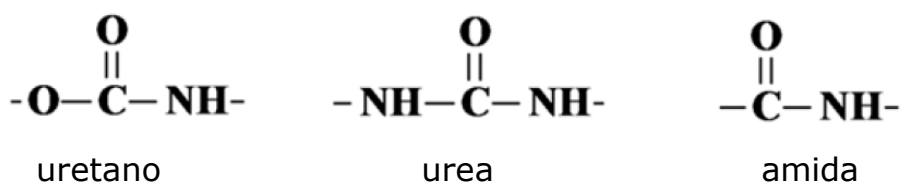


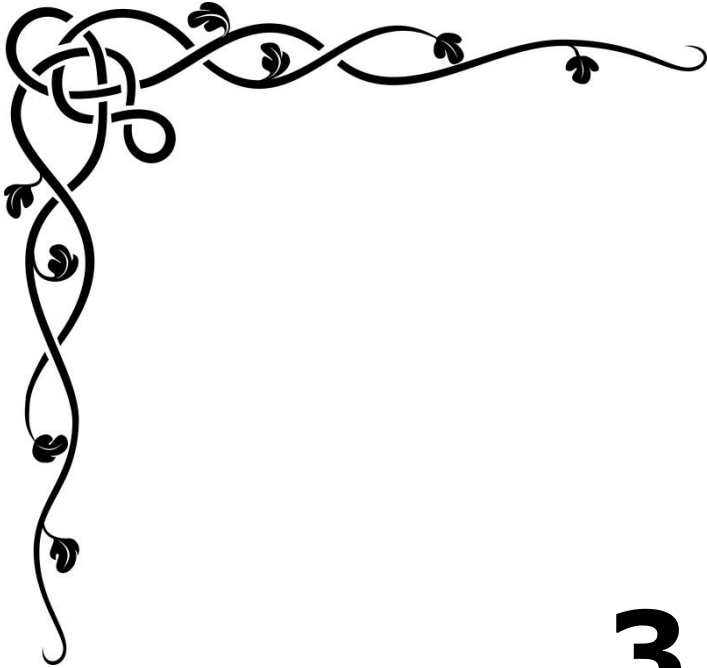
Figura 3. Grupos uretano, urea y amida. Estos grupos forman los eslabones de las cadenas poliméricas, y son formadas a partir de isocianatos y grupos nucleofílicos.

Los PU son no tóxicos, biocompatibles, biodegradables y calcifican *in vivo* [41-44]. También se ha demostrado su participación en la

inducción de la adhesión celular y la proliferación de osteoblastos humanos entre otros tipos de células [42].

Se han sintetizado PU utilizando compuestos osteogénicos tales como ácido ascórbico, L-glutamina, β -glicerolfosfato y dexametasona como extensores de cadena. Esos PU tienen un potencial significativo para el uso en la regeneración del tejido óseo debido a sus propiedades mecánicas variables y alta biotolerancia. Se ha determinado que permiten la adhesión y proliferación de CTMh, además de una elevada expresión de fosfatasa alcalina y un alto potencial de mineralización, por lo que son un material muy prometedor que se han distinguido para la investigación adicional con los estudios *in vivo* y otros mecanismos de la caracterización para la regeneración del tejido del hueso [45].

En este trabajo se emplearon cuatro andamios a base de PU, en cuyo proceso de síntesis se les adicionaron compuestos osteoinductivos a tres de ellos bajo diversas condiciones físicas, siendo el andamio 1 sólo de PU, el andamio 2 PU y β -glicerolfosfato, el andamio 3 PU y dexametasona, y el andamio 4 PU y ácido ascórbico. Estos andamios están en vías de patentarse, por lo que su proceso de síntesis se omite en este trabajo de tesis.



3.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

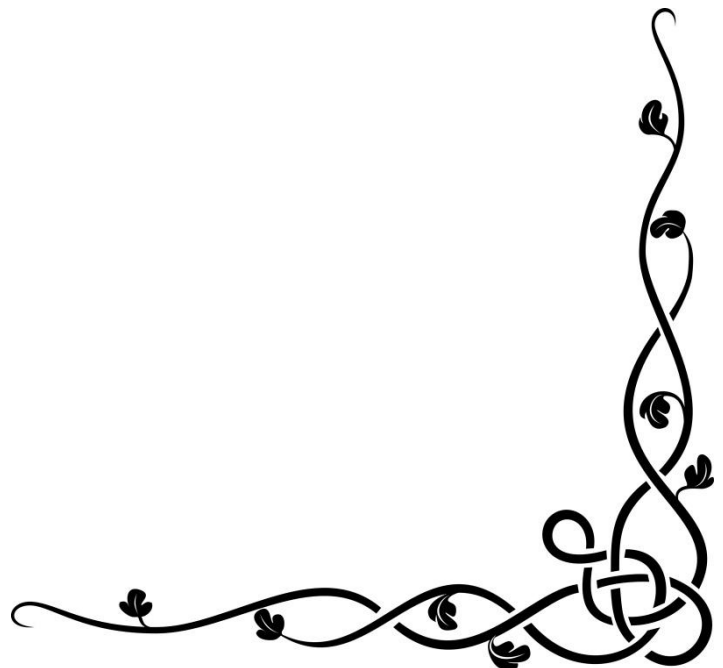
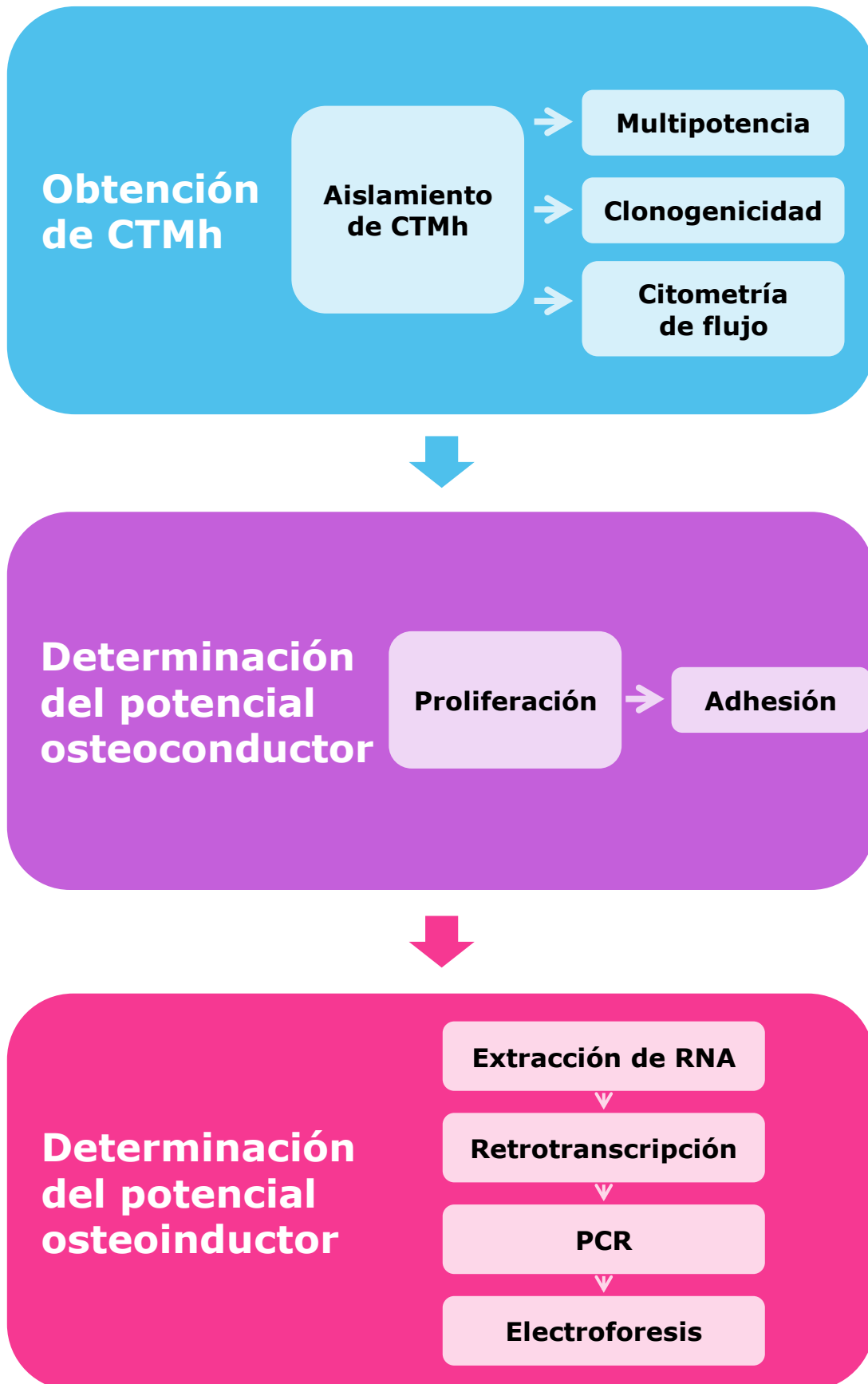


DIAGRAMA GENERAL DE PROCEDIMIENTO



3.1 OBTENCIÓN DE CTMh

3.1.1. Aislamiento de CTMh de membrana amniótica de placenta

Se obtuvieron placentas humanas de nacimientos por cesárea donadas por las pacientes, previo consentimiento informado (ANEXO).

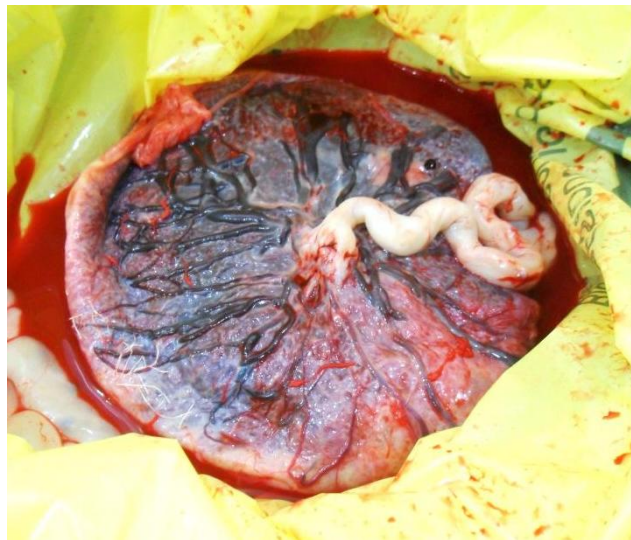


Figura 4. Placenta humana obtenida por cesárea. La cara fetal de la placenta tiene adherida parte de la membrana amniótica que contiene a las CTMh. En el centro se observa el cordón umbilical (blanco) el cual sirve de referencia para cortar la membrana amniótica periumbilical.

Con una mano se sostuvo el cordón umbilical y con la otra mano se separó la membrana amniótica de la cara fetal de la placenta, en un área con radio aproximado de 5 cm del cordón umbilical. En algunos casos donde también se extrajo el corion éste se separó manualmente

de la membrana amniótica distinguiendo al corion como una membrana más gruesa y opaca que la membrana amniótica como lo reportó previamente Rodríguez- Fuentes y colaboradores [46].

Una vez aislada la membrana amniótica, se lavó con amortiguador de fosfato salino (PBS) 1x (Merck®) y pinza simple hasta eliminar todos los residuos y restos de sangre. Posteriormente se cortó la membrana amniótica en pequeños fragmentos con el bisturí para mejorar el tratamiento enzimático al aumentar la superficie de contacto.

Se incubaron los fragmentos de membrana amniótica con tripsina:EDTA al 0.25% (Thermo Fisher Scientific®), a una temperatura de 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% en un tubo cónico de 50 mL durante 30 minutos, agitando el tubo cada 10 minutos. Después se retiró el tubo de la incubadora y se filtró el contenido con tela organza estéril descartando la solución de tripsina filtrada y recuperando los fragmentos sólidos retenidos en la organza en un tubo nuevo, los cuales corresponden a la matriz extracelular de la membrana amniótica en cuyo interior aún se encuentran las CTMh.

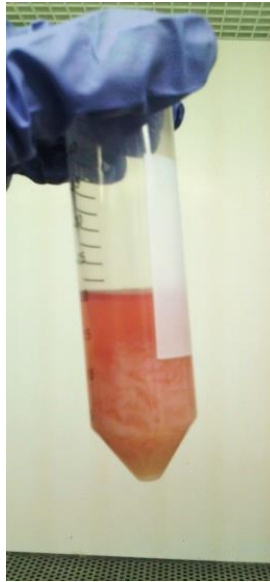


Figura 5. Digestión enzimática con tripsina:EDTA. Tubo cónico que contiene los fragmentos de membrana amniótica en proceso de digestión enzimática con tripsina:EDTA al 0.25%.

Al nuevo tubo con los fragmentos sólidos se le agregó solución de colagenasa II (Thermo Fisher Scientific®) al 0.01% en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alta glucosa sin suero (Thermo Fisher Scientific®) y se incubó durante 2 horas a una temperatura de 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, agitando el tubo cada 30 minutos. Después de la digestión con colagenasa II se sacó el tubo de la incubadora y se filtró nuevamente el contenido conservando ahora el líquido, que contiene a la suspensión celular, y lavando con PBS los residuos que quedaron en la tela organza.

Para lavar la suspensión celular obtenida, se adicionó al tubo PBS hasta completar 50 mL y se centrifugó a 174 x g durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante quedando sólo el botón celular. Para el conteo celular se adicionaron 5 mL de DMEM con suero fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific®) y se resuspendió el botón celular. Se tomaron 10 µL de la suspensión celular y se mezclaron con 10 µL de azul tripano (Merck®), el volumen se colocó en cámara de Neubauer. Se contaron las células vivas (las que excluyeron el colorante) que se encontraban en los cuatro cuadrantes de las esquinas (cuyo volumen de cada uno es de 0.0001 mL) y se realizó el cálculo de la concentración celular de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mililitro}} = \text{total de células contadas en los cuatro cuadrantes} \left(\frac{1}{(4 \times 0.0001 \text{ mL})} \right)$$

Se realizó la expansión celular preparando una suspensión celular de aproximadamente 4×10^4 células/mL en DMEM con SFB y se colocaron 5 mL de esta suspensión en frascos de cultivo celular T-75. Se incubaron los frascos a una temperatura de 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas, después de las cuales se eliminaron las células no adherentes mediante lavado con PBS y cambio de medio de cultivo. Se realizó cambio de medio de cultivo cada 3 días hasta obtener una confluencia celular del 90%.

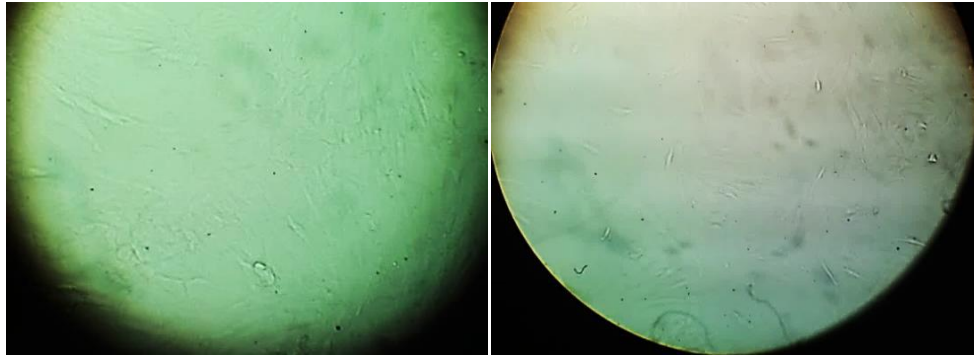


Figura 6. CTMh al día 3 de cultivo celular. Células adherentes vistas en el microscopio óptico a 40x. Se observan las células translúcidas y alargadas (forma fibroblastoide), indicando su adherencia al fondo del frasco.

Para los pases celulares los frascos se cultivaron hasta una confluencia de 90%, después se retiró el medio de cultivo y se les adicionó tripsina:EDTA al 0.25% hasta cubrir la superficie de crecimiento celular, se incubó a una temperatura de 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por aproximadamente 15 minutos, durante los cuales se promovió el desprendimiento celular por medio de pequeños golpes al frasco, y se observó el progreso de la reacción en el microscopio. Una vez desprendidas las células del frasco se detuvo la reacción colocando la suspensión celular en tubos cónicos que previamente contenían DMEM suplementado con SFB y realizando lavados a los frascos para recuperar las células restantes. Se centrifugaron los tubos a 174 x g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en medio de cultivo y se expandió nuevamente en frascos de cultivo a

una concentración aproximada de 4×10^4 células/mL en DMEM con 10% de SFB.

Se mantuvo el cultivo hasta el cuarto pase celular para los ensayos posteriores.

3.1.2. Multipotencia

Para probar el potencial de diferenciación de las CTMh se prepararon medios de cultivo inductores de diferentes linajes, los cuales fueron los siguientes:

Tabla 1. Medios inductores para multipotencia.

Control	Osteogénico	Adipogénico	Condrogénico
DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
SFB 10%	SFB 10%	SFB 10%	SFB 10%
antibiótico- antimicótico 1%	antibiótico- antimicótico 1%	antibiótico- antimicótico 1%	antibiótico- antimicótico 1%
	β -glicerol fosfato 10 mM	Insulina bovina 1.6 μ M	TGF- β 100 ng/mL
	Dexametasona 10 nM	1-metil-3- isobutilxantina 0.5 mM	
	Ácido ascórbico 50 μ g/mL	Indometacina 50 μ g/mL	

La tabla presenta los inductores necesarios para la diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos.

En una placa de cultivo celular de 24 pozos se colocó un volumen de 500 μL de cada medio por triplicado (sólo se utilizaron 12 pozos) y una cantidad de 6,000 células obtenidas por tripsinización, esta placa se incubó a una temperatura de 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% por 21 días después de los cuales se retiraron los medios de cultivo, se lavaron los pozos suavemente con PBS 1x dos veces, y se realizó una tinción específica para cada caso:

Control

Los pozos se incubaron con 300 μL de metanol por 5 minutos, se retiró el metanol y se secaron al aire por 5 minutos, se tiñeron con cristal violeta por 10 minutos y se lavaron con agua.

Osteogénico

Se incubaron los pozos correspondientes con paraformaldehído (PFA) 4% por 1 hora, se lavaron con PBS 1x, se tiñeron con rojo de alizarina al 2% por 5 minutos y se lavaron con agua de la llave por 5 minutos (3 veces), luego se contratiñeron con hematoxilina por 10 minutos y se lavaron con agua de la llave.

Adipogénico

Se fijaron con PFA por 10 minutos los pozos correspondientes, se tiñeron con rojo oleoso en 60% de isopropanol por 10 minutos, se lavaron con isopropanol al 60% y se dejaron secar al aire libre.

Condrogénico

Los pozos correspondientes se incubaron con 300 μ L de fijador PFA 4% por 20 minutos, se tiñeron con azul alcian por 1 hora 30 minutos, se lavaron con HCl 0.1 M por 5 minutos y luego con agua de la llave por 5 minutos, se contratiñeron con hematoxilina por 10 minutos y se lavaron con agua de la llave.

3.1.3. Clonogenicidad

Esta prueba se realizó para evaluar la capacidad de las células de formar colonias. En placas de cultivo de 100 mm de diámetro, se colocaron células obtenidas por tripsinización a diferentes concentraciones: 0, 50 y 100 células/mL (por triplicado). Las placas se incubaron a una temperatura de 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 14 días, posteriormente los pozos se tiñeron con cristal violeta por 10 minutos y se lavaron con agua. Se contaron las colonias formadas.

3.1.4. Citometría de flujo

Este análisis se realizó para cuantificar simultáneamente diversos parámetros morfológicos (tamaño, granularidad) e inmunofenotípicos (expresión específica de antígenos de superficie) de las células. Las células recuperadas por tripsinización se colocaron en un tubo que contenía PFA al 4% y se enviaron a analizar a un equipo de citometría de flujo. Para la inmunofenotipificación se utilizaron los marcadores fluorescentes Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) para el Clúster de Diferenciación 90 (CD90), Ficoeritrina (PE) para CD73, y Ficoeritrina con Colorante de Cianina (PE-Cy5) para CD105.

3.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOCONDUCTOR

3.2.1. Proliferación celular

Se realizó el ensayo de proliferación para probar el efecto de los andamios A1 (PU), A2 (PU + β -glicerolfosfato), A3 (PU + dexametasona), A4 (PU + ácido ascórbico) en la citotoxicidad y en la activación celular. Los cuatro andamios se ajustaron al área del fondo de un pozo de una placa de cultivo celular de 96 pozos, se fijaron al mismo mediante acrilamida al 4% y se esterilizaron por radiación UV durante 30 minutos. Las CTMh, recuperadas previamente por tripsinización, se

cultivaron con los andamios en DMEM con AlamarBlue al 10%, que consiste de una solución de resazurina, un compuesto permeable a las células de color azul que se reduce a resorufina (de color rosa) por el metabolismo celular, funcionando así como un indicador de viabilidad celular. Se determinó la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm con referencia a 600 nm a las 0 horas y cada 24 horas durante los 7 días de cultivo.

3.2.2. Adhesión celular

Este ensayo se realizó para probar la capacidad de las células para interactuar y adherirse a la superficie de los andamios. Posterior a la prueba de proliferación celular, los andamios se retiraron de las placas de cultivo y se colocaron en un equipo de pulverización iónica de capa fina, al igual que los controles negativos (andamios que no se cultivaron con células), para que cubriera las muestras con una capa de oro.



Figura 7. Procesamiento de muestras para MEB. Equipo de pulverización iónica de capa fina en proceso (izquierda) y MEB(derecha).

Después las muestras y los controles se colocaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) donde se observaron a un voltaje de 15 kV a diferentes aumentos (de 500X hasta 800X).

3.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOINDUCTOR

Para evaluar la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica se realizaron los siguientes experimentos:

3.3.1. Extracción de ácido ribonucleico (RNA)

Para aislar el RNA de las células, una vez finalizado el ensayo de proliferación celular, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se adicionó trizol, se homogeneizó con ayuda de una micropipeta (succión-expulsión) para favorecer la lisis celular, se transfirió el homogeneizado a un tubo cónico y se incubó a 25°C durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.

Para la separación se adicionaron 200 µL de cloroformo a las muestras, se mezclaron vigorosamente y se incubaron por 3 minutos a 25°C, luego se centrifugaron a 182 x g a una temperatura de 4°C por 15 minutos después de los cuáles las muestras se separaron en cuatro fases.

Se prosiguió con la precipitación de las muestras de la siguiente manera: se recuperó la fase acuosa (fase superior sin color), aproximadamente 600 μ L, y se transfirió a un nuevo tubo, se le adicionó 500 μ L de isopropanol y se incubó a 25°C por 10 minutos. Se centrifugó a 182 xg durante 10 minutos a una temperatura de 4°C y se descartó cuidadosamente el sobrenadante para evitar aspirar el RNA precipitado de color transparente.

En el lavado se adicionó 1 mL de etanol al 75% y se mezcló durante 1 minuto utilizando un vortex. Para hacer la disolución se centrifugaron las muestras a 7500 x g por 5 minutos a una temperatura de 4°C, se descartaron los sobrenadantes y se incubaron los botones de RNA a 25°C evitando que se secan por completo. Se disolvieron los RNAs en 50 μ L de agua desionizada estéril libre de DNAsas y RNAsas.

3.3.1.1. Cuantificación de RNA

Se cuantificaron todas las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm para obtener su concentración en masa/volumen.

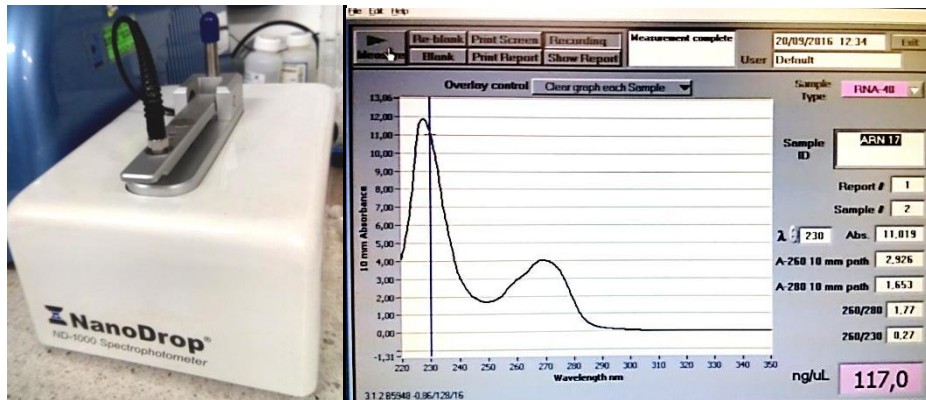


Figura 8. Espectrofotómetro de ácidos nucleicos. Del lado izquierdo se muestra el equipo y del lado derecho se observa una ventana de programa en proceso.

3.3.2. Retrotranscripción

Para obtener el ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) del RNA extraído, se incubaron alícuotas de 5 μL de RNA con 1 μL de primer de desoxi-timidina (Oligo dT) 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Thermo Fisher Scientific®), 1 μL de desoxirribonucleótidos trifosfato mix (dNTP) 10mM (Thermo Fisher Scientific®), y 8 μL de agua, a una temperatura de 65°C por 5 minutos, posteriormente se les adicionó 2 μL de amortiguador de transcriptasa reversa (RT buffer) 10x (Thermo Fisher Scientific®), y 2 μL del agente reductor ditioneitol (DTT) 0.1M (Thermo Fisher Scientific®), se incubaron a 42°C por 2 minutos después de los cuales se les adicionó 1 μL de enzima transcriptasa reversa 50 U/ μL (Thermo Fisher Scientific®), y se incubaron a 42°C por 50 minutos y posteriormente a 70°C por 15 minutos.



Figura 9. Retrotranscripción de RNA. La imagen muestra el termociclador empleado para retrotranscribir el RNA aislado para obtener cDNA.

3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta reacción tiene la finalidad de obtener múltiples copias de un segmento génico específico. Se utilizaron los siguientes primers para el gen constitutivo gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y para el marcador osteogénico Factor de Unión al Núcleo Alfa 1 (CBFA-1) [47].

Tabla 2. Primers empleados en la PCR.

Gen	Primer sentido (5'→3')	Primer antisentido (5'→3')	Tamaño de fragmento (pb)
GAPDH	ATCTTCCAGGAGCGAGATCC	ACCACTGACACGTTGGCAGT	503
CBFA-1	CGACAGCCCCAACTTCTGTG	TGCCTTCTGGGTTCCCGA	556

Se presenta las secuencias de los primers utilizados en la PCR, tanto para el gen constitutivo GAPDH, como para el gene osteogénico CBFA-1.

(A-adenina, G-guanina, C-citocina, T-timina, pb-pares de bases).

En un tubo cónico con tapa se colocaron para cada muestra 14.4 μL de agua, 2.0 μL de amortiguador de reacción 10x (Roche®), 0.4 μL de dNTP mix 10mM (Roche®), 1.0 μL del primer sentido 10 μM , 1.0 μL del primer antisentido 10 μM , 0.2 μL de Taq polimerasa 5U/ μL (Roche®), y 2.0 μL del cDNA. Los tubos fueron colocados en el termociclador e incubados bajo las siguientes condiciones:

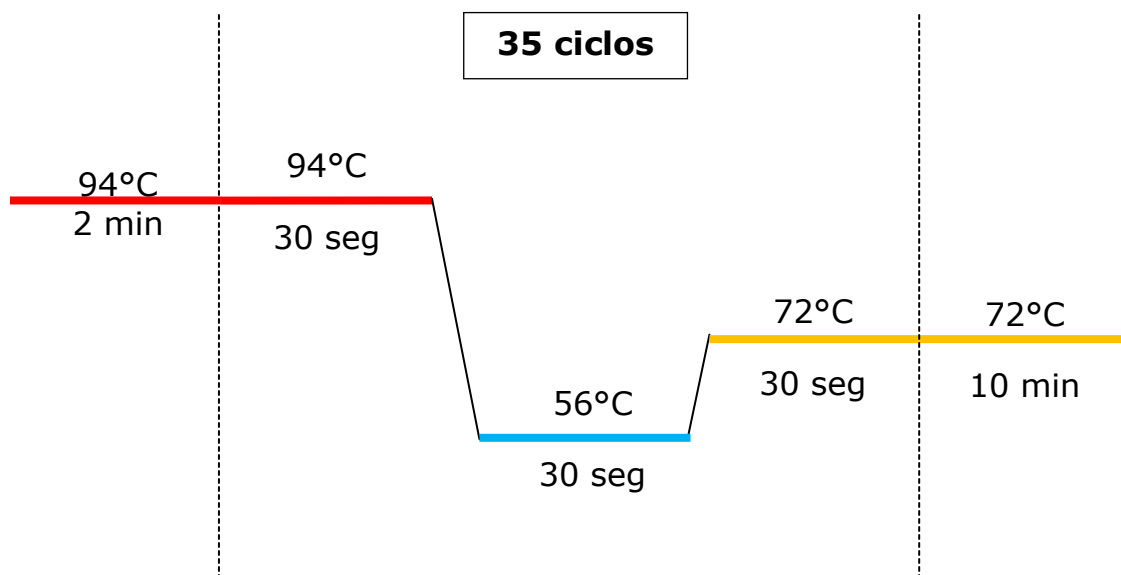


Figura 10. Esquema de las condiciones para la PCR. Se observan las etapas de la PCR. (Rojo) Desnaturalización del DNA de doble cadena, (Azul) Hibridación de los primers a la zona específica de cada una de las hebras y (Amarillo) Extensión de los primers por actuación de la DNA polimerasa.



Figura 11. Preparación de termociclador para PCR. Se colocaron las muestras en el termociclador y se realizó la programación de las condiciones para la PCR.

3.3.4. Electroforesis

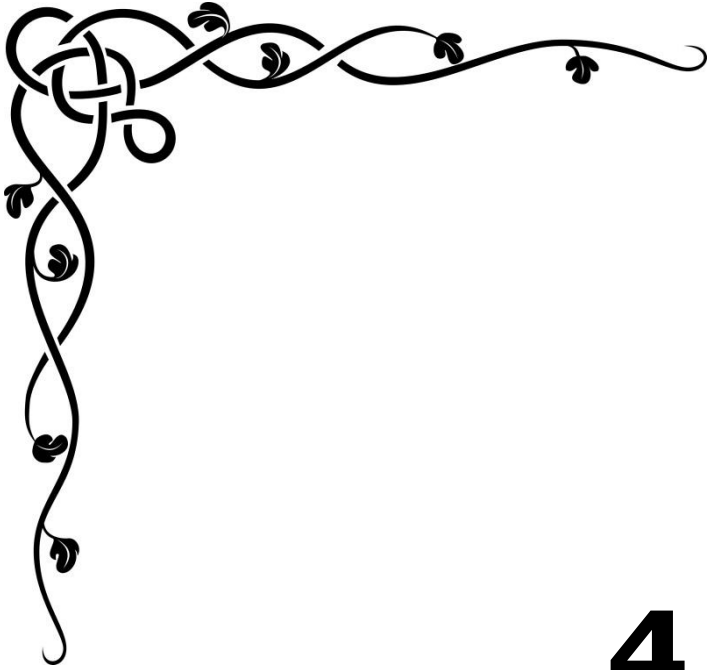
Este procedimiento fue de utilidad para separar de acuerdo a su peso molecular los segmentos de ácidos nucleicos de las muestras. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa (Promega®) al 2% en amortiguador tris acetato-EDTA (TAE) al 1X, con 3 μ L de bromuro de etidio (Promega®) como revelador, y se corrieron a 80 V por 45 minutos utilizando una escalera de peso molecular HAE III Fragments ® de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pares de bases (pb).



Figura 12. Equipo de electroforesis con muestra en proceso. En la izquierda está la fuente de potencial eléctrico y en la derecha se muestra la cámara de electroforesis.

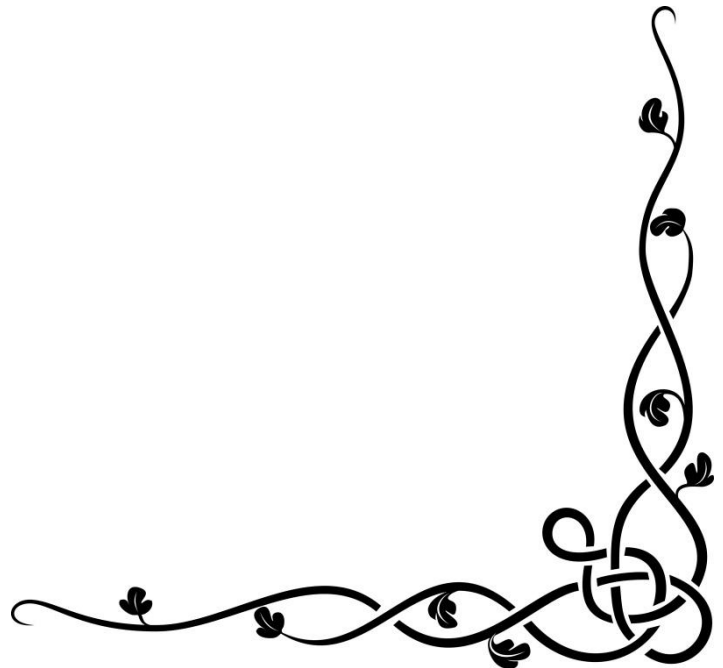


Figura 13. Proceso para revelar geles de electroforesis. Del lado izquierdo se observa el gel que se va a revelar y del lado derecho el equipo fotodocumentador.



4.

RESULTADOS



4.1. OBTENCIÓN DE CTMh

4.1.1. Multipotencia

Se observaron las placas al microscopio óptico a un aumento de 40x (Figura 14). La tinción con cristal violeta mostró la morfología celular siendo el núcleo más oscuro que el citoplasma. La tinción con rojo de alizarina reveló los depósitos de calcio de las células. La tinción con rojo oleoso reveló estructuras adiposas de la célula. Por último, la tinción con azul alcian mostró las mucinas y carbohidratos ácidos.

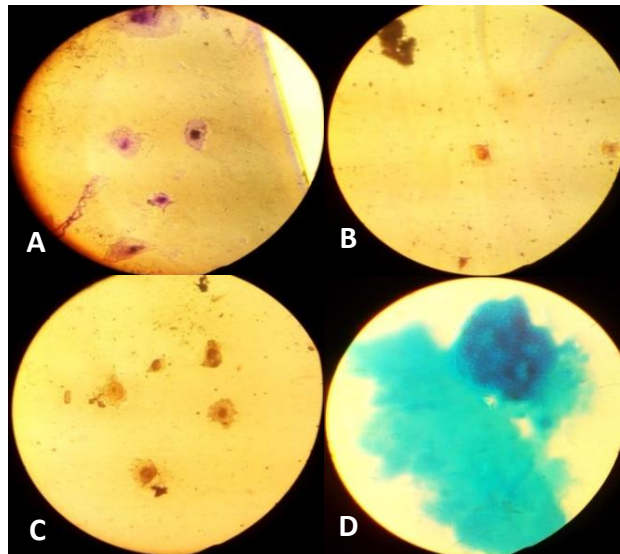
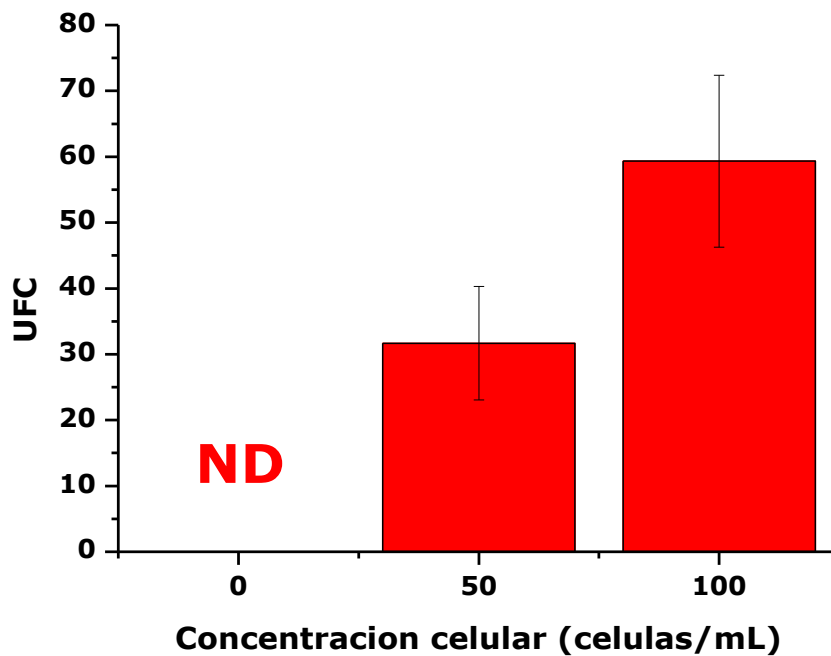


Figura 14. Células teñidas específicamente vistas en microscopio óptico a 40x. (A) Tinción de morfología celular con cristal violeta. (B) Tinción de depósitos de calcio con rojo de alizarina. (C) Tinción de estructuras adiposas con rojo oleoso. (D) Tinción de mucinas y carbohidratos ácidos con azul alcian.

4.1.2. Clonogenicidad

Se contaron las colonias visibles a simple vista teñidas de color morado y se obtuvieron un promedio de 0, 31.6 y 59.3 unidades formadoras de colonia (UFC) para las concentraciones de 0, 50 y 100 células/mL sembradas respectivamente. (Gráfica 1).



Gráfica 1. Clonogenicidad (UFC vs. Concentración celular). No se detectaron UFC en la concentración de 0 cél/mL (ND), en la concentración de 50 cél/mL se obtuvo un promedio de 31.6 UFC, mientras que en la concentración de 100 cél/mL se obtuvo un promedio de 59.3 UFC.

4.1.3. Citometría de flujo

De acuerdo al tamaño y a la granularidad, se tomó la región R1 como ventana de estudio (Figura 15-A). En la inmunofenotipificación se observa que de un total de 27,129 eventos, $0.14 \pm 0.01\%$ fueron positivos para la co-expresión CD73 y CD90 (región R3 de la Figura 15-B), mientras que $0.08 \pm 0.01\%$ fueron positivos para la co-expresión de CD105 y CD90 (región R11 de la Figura 15-C).

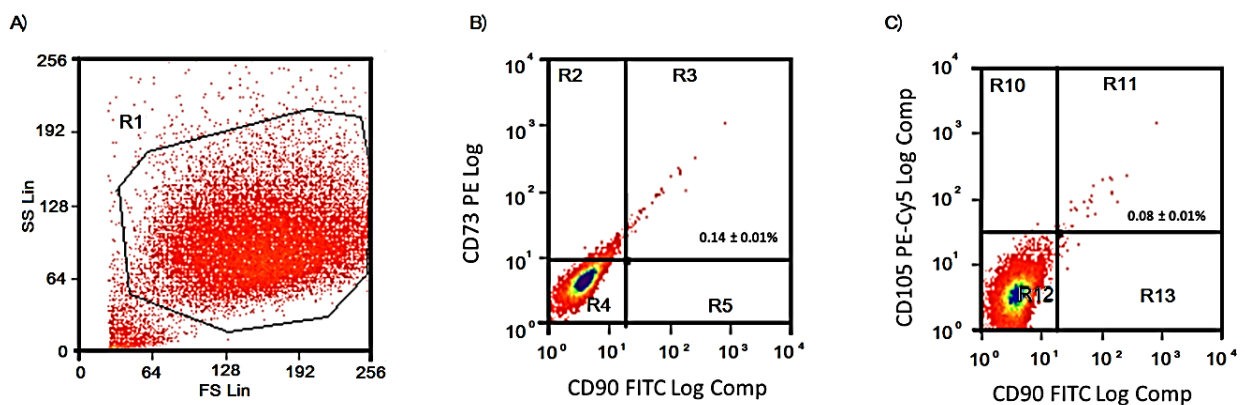
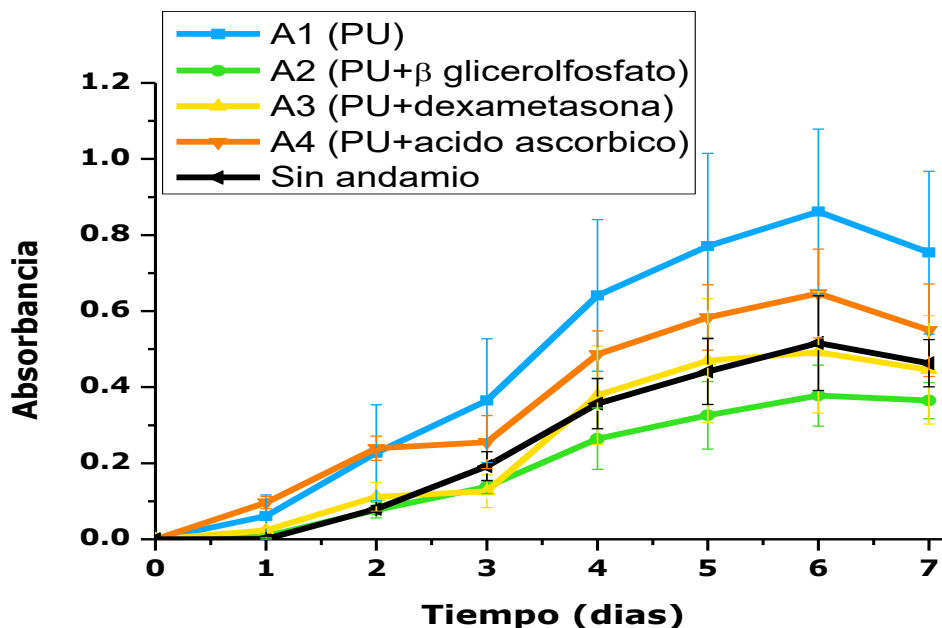


Figura 15. Morfología e inmunofenotipo de las células. A) Distribución celular de acuerdo a su tamaño (FS) vs granularidad (SS), la región R1 se tomó como la ventana de estudio B) Co-expresión de CD73 vs CD90 (región R3). C) Co-expresión de CD105 y CD90 (región R11).

4.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOCONDUCTOR

4.2.1. Proliferación

En la Gráfica 2 se observa que para todos los casos existe un aumento de la absorbancia y por lo tanto de la proliferación a lo largo de los días hasta el día 6, después del cual la absorbancia disminuye. Los andamios 1 (PU) y andamio 4 (PU + ácido ascórbico) presenta mayor proliferación que el control (sin andamio), el andamio 3 (PU + dexametasona) presenta una proliferación muy similar al control, y el andamio 2 (PU + β -glicerolfosfato) presenta una proliferación menor.



Gráfica 2. Proliferación celular (Absorbancia vs. Tiempo). Para todos los casos se observa un aumento progresivo de la absorbancia hasta el día 6, después del cual la absorbancia disminuye.

4.2.2. Adhesión celular

En la figura 16 se observan al microscopio electrónico de barrido (MEB) los andamios a los que no se le cultivaron células (control) en el lado izquierdo, y los andamios después del ensayo de proliferación (experimental) en el lado derecho después de siete días de cultivo; estas observaciones se realizaron a 15 kV y a diferentes aumentos. No se observan células en los andamios control mientras que en los andamios experimentales se aprecia un desgaste por el medio líquido en el que estuvieron en contacto, sin embargo, sólo se observa una célula en el centro de la imagen del andamio 4 (PU + ácido ascórbico).

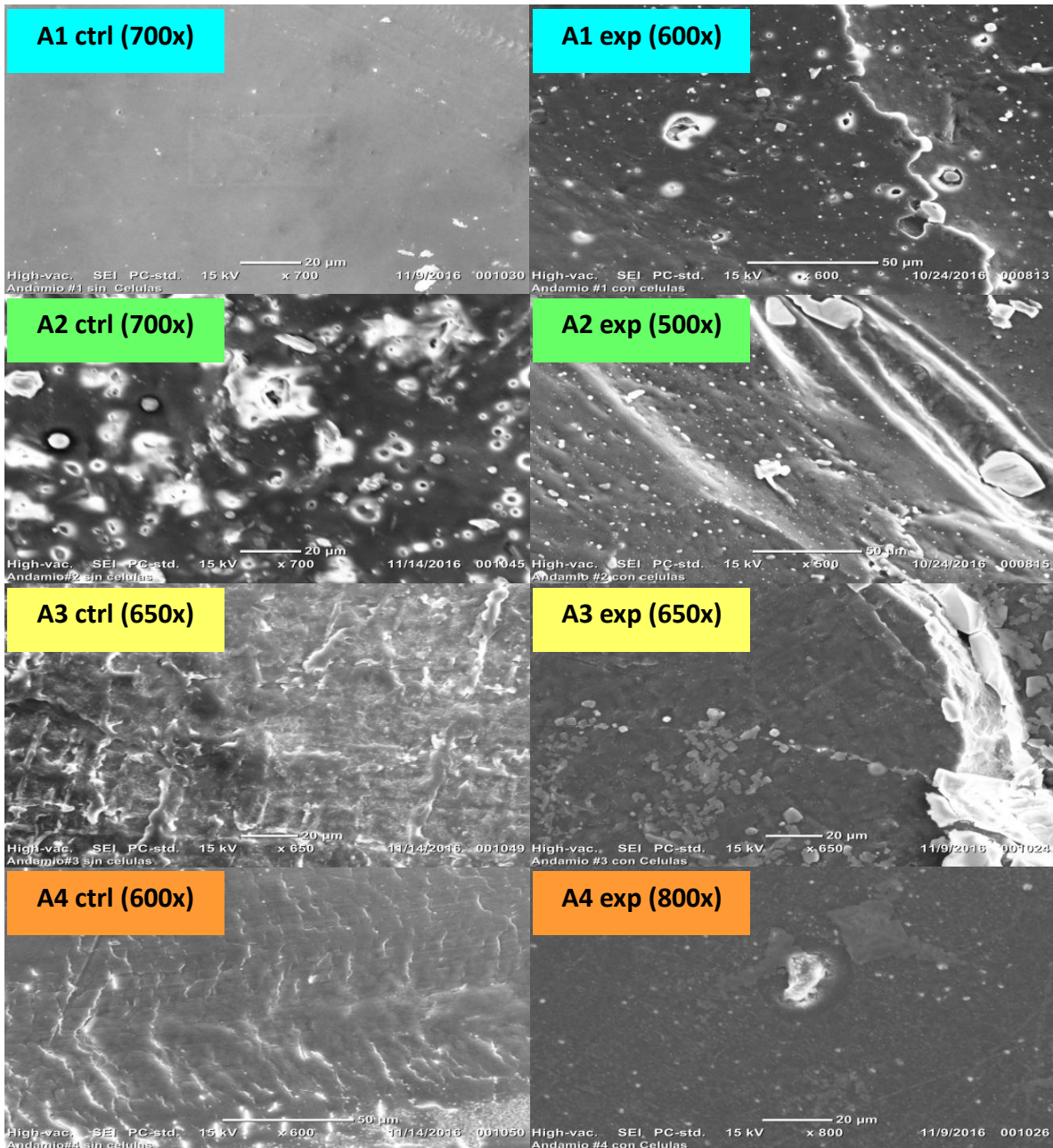


Figura 16. Micrografías electrónicas de los andamios a base de

PU. Micrografía de los andamios control (izquierda) y los andamios experimentales (derecha) a 15 kV y diferentes aumentos. A1 (PU), A2 (PU + β -glicerolfosfato), A3 (PU + dexametasona), A4 (PU + ácido ascórbico). Se observa una célula en el centro de la imagen del A4 experimental.

4.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOINDUCTOR

En la figura 17 se observa el gel de la PCR de las muestras amplificadas con los primers para el gen constitutivo GAPDH, se observa en todos los andamios una banda (503 pb), lo que significa que las células cultivadas con los diferentes andamios expresan ese gen.

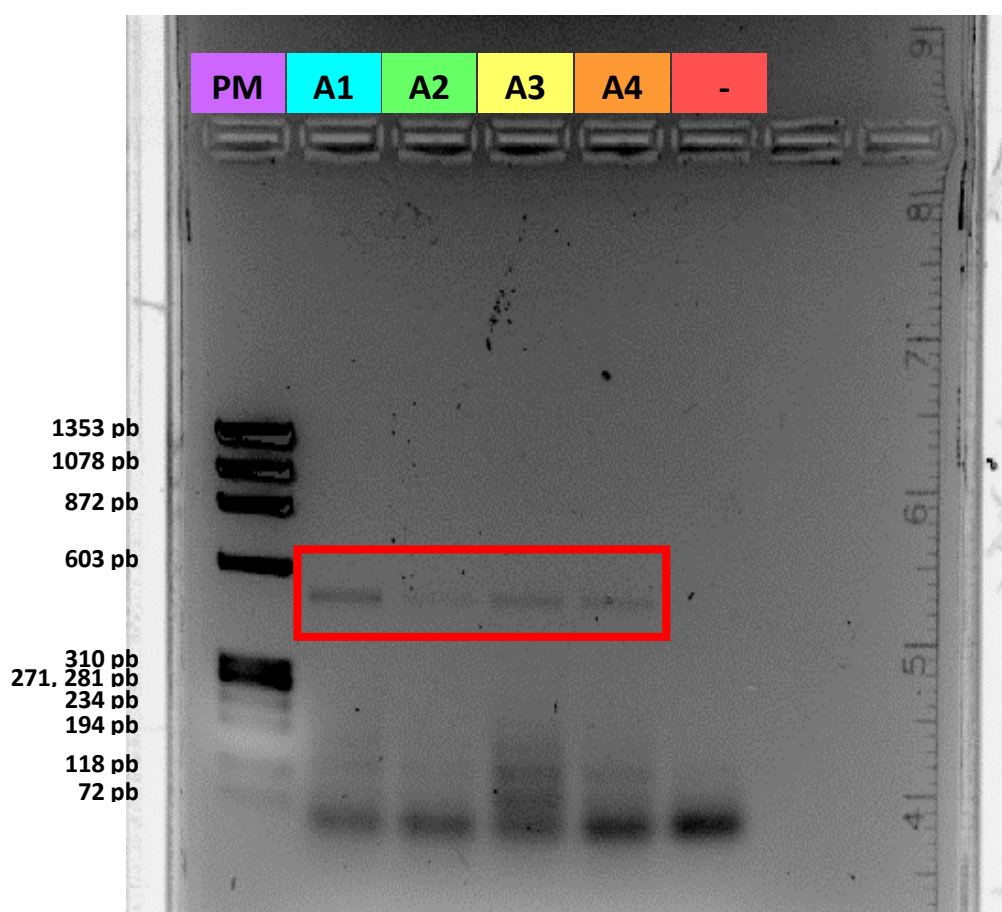


Figura 17. Electroforesis reveladora de PCR de GAPDH. Efecto de los Andamios de PU sobre la expresión del gene constitutivo GAPDH. A1 (PU), A2 (PU + β -glicerolfosfato), A3 (PU + dexametasona) y A4 (PU + ácido ascórbico).

En la figura 18 se presenta el gel de la PCR de las muestras amplificadas con los primers para el marcador osteogénico CBFA-1 (556 pb), no se logra apreciar ninguna banda en las muestras cultivadas con los diferentes andamios.

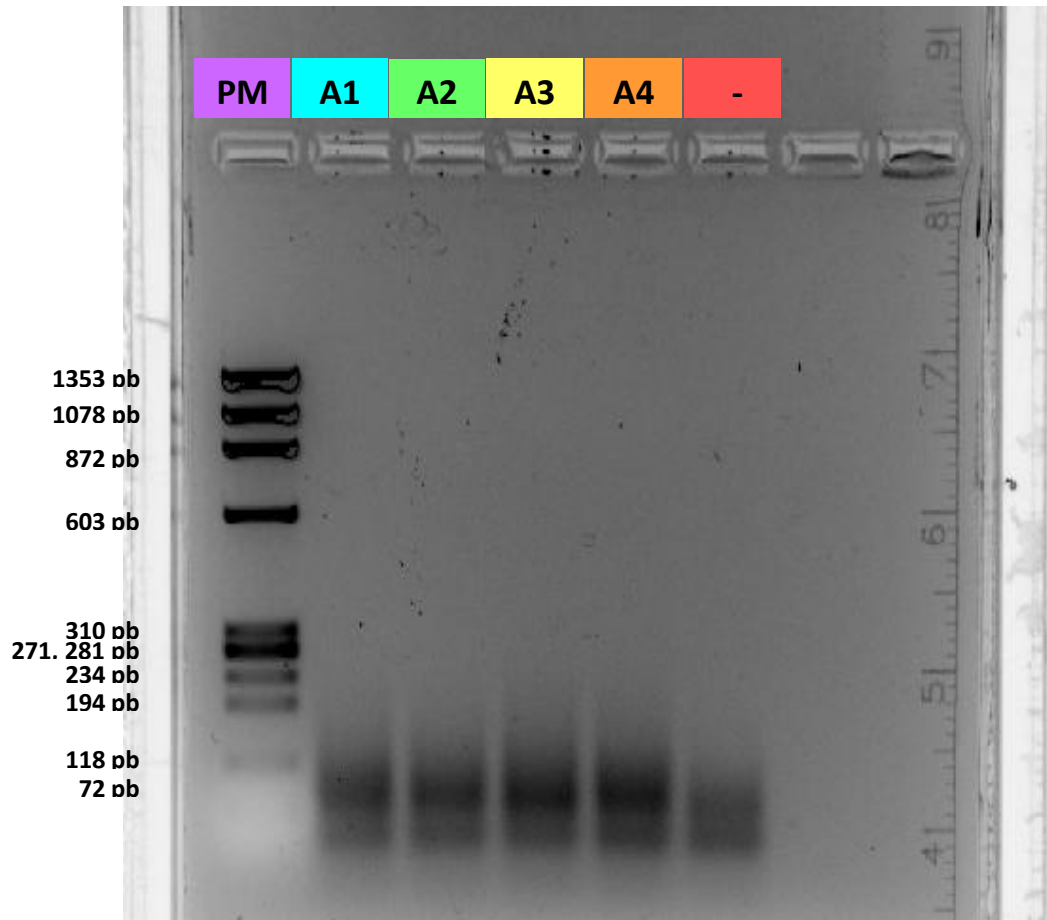
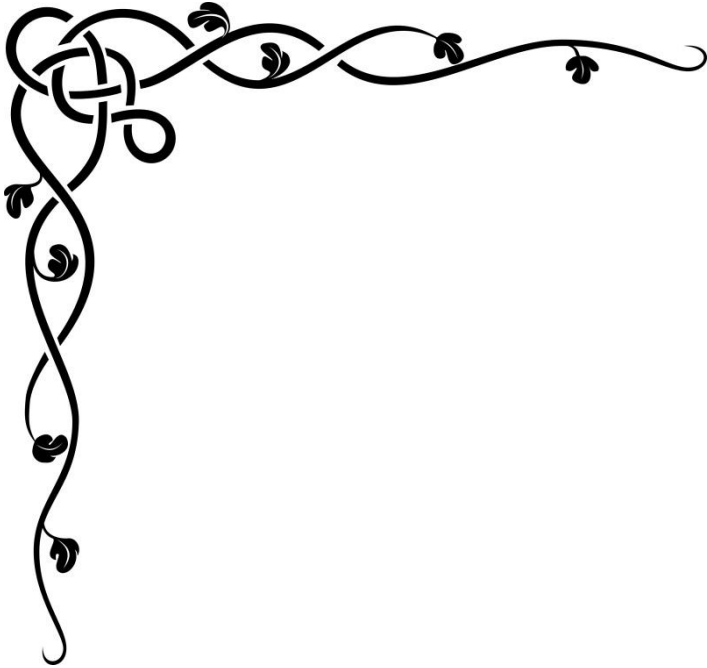
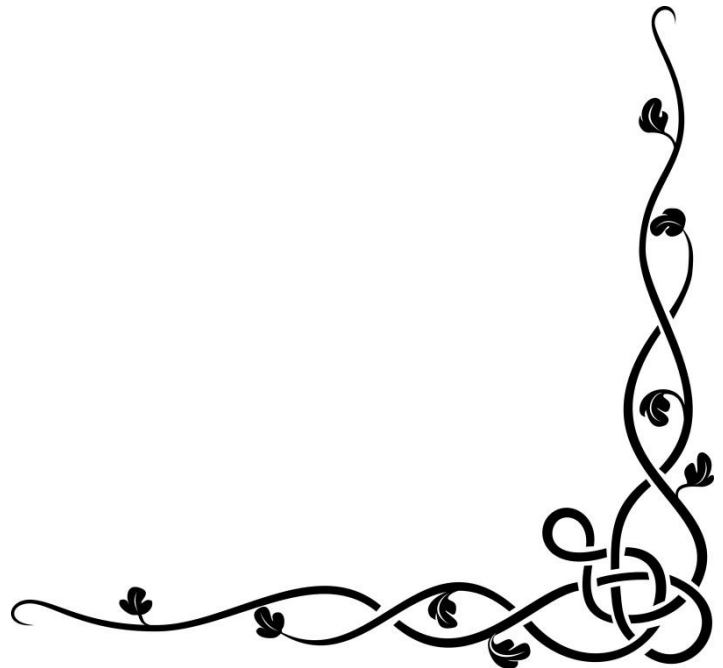


Figura 18. Electroforesis reveladora de la PCR para el marcador osteogénico CBFA-1. Efecto de los Andamios a base de PU sobre la expresión de CBFA-1. A1 (PU), A2 (PU + β -glicerolfosfato), A3 (PU + dexametasona) y A4 (PU + ácido ascórbico).



5.

DISCUSIÓN



5.1. OBTENCIÓN DE CTMh

5.1.1. Multipotencia

El ensayo de multipotencia (Figura 14) reveló que las células troncales mesenquimales humanas desarrollan estructuras de los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico según el medio con el que se cultivaron. Estos resultados indican que las células troncales obtenidas conservan la capacidad de multipotencia hacia los tres linajes celulares establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular [48].

5.1.2. Clonogenicidad

Los resultados de la prueba de clonogenicidad (Gráfica 1) revela que a mayor densidad de células sembradas, mayor cantidad de UFCs. El resultado positivo para este ensayo, indica que las células obtenidas en este trabajo, preservan su capacidad de autorrenovación, lo cual es una característica intrínseca de las células troncales.

5.1.3. Citometría de Flujo

Las células troncales obtenidas resultaron positivas para CD105, CD90 y CD73 (Figura 15), sin embargo, el porcentaje de positividad para estos

marcadores fue baja, representado por menos de 0.2% de la población total analizada (30,000 células). Este resultado puede deberse a que las células empleadas en el ensayo de citometría se recolectaron dentro del proceso de depuración celular, en el cual, la población de CTMh no ha sido enriquecido, dado que coexisten con fibroblastos y precursores hematopoyéticos, así como precursores osteoblásticos, los cuales corresponden a linajes celulares típicos del nicho en el cual las CTMh se encuentran inmersas de manera fisiológica. Adicionalmente, se ha reportado que la presencia de ciertos marcadores mesenquimales debe coordinarse con la ausencia de marcadores hematopoyéticos, por lo cual se proyecta realizar estudios una vez concluido el proceso de depuración del cultivo e incrementar la concentración celular.

Del mismo modo, es importante mencionar que la baja positividad a los marcadores mesenquimales, no limita la confirmación de que las células empleadas en este proyecto tengan el fenotipo mesenquimal, en virtud de que las células obtenidas fueron positivas para los ensayos de clonogenicidad y de multipotencia como lo establece la Sociedad Internacional de Terapia Celular [48], así como a la capacidad de adherencia al plástico y la morfología fibroblastoide.

5.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOCONDUCTOR

5.2.1. Proliferación celular

Los cuatro andamios promovieron la proliferación celular exhibiendo una tendencia sigmoidea (Gráfica 2), siendo los andamios 1 (PU) y 4 (PU + ácido ascórbico) los que promovieron una mayor proliferación celular en comparación con los andamios 2 (PU + β -glicerolfosfato) y 3 (PU + dexametasona) y con el control. Esto indica que ninguno de los andamios es citotóxico y además promueven un mayor crecimiento en las células. El andamio 1 promueve mayor proliferación que el andamio 4, lo que indica que el PU por si sólo promueve mayor proliferación que con los compuestos osteoinductores.

5.2.2. Adhesión celular

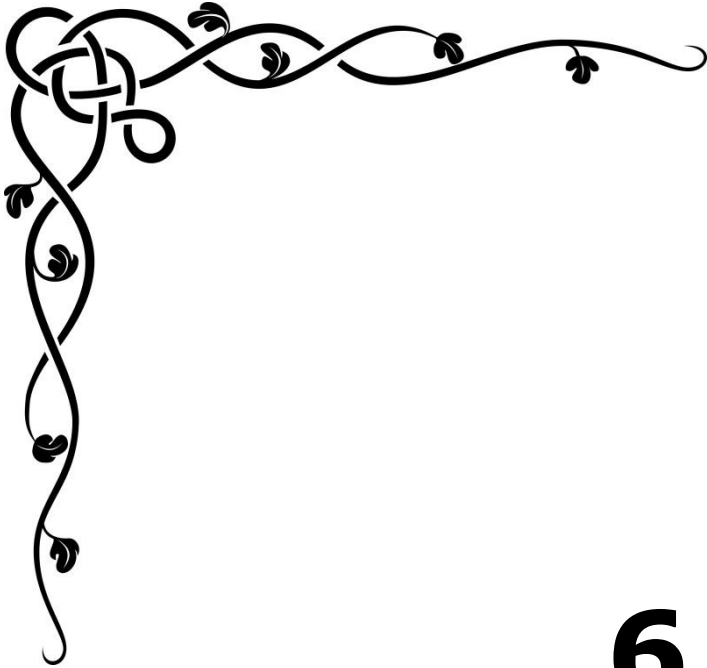
No se observan células en los andamios control, mientras que en los andamios que se cultivaron con las células se observa un desgaste probablemente debido al contacto con el medio de cultivo. También logra observarse una célula en el centro de la imagen del andamio 4 (PU + ácido ascórbico) (Figura 16), mostrando que el ácido ascórbico promueve mejor adhesión que los otros compuestos osteoinductores.

Adicionalmente se pretende cultivar mayor número de células en los andamios para evidenciar por MEB su adherencia a los materiales.

5.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOINDUCTOR

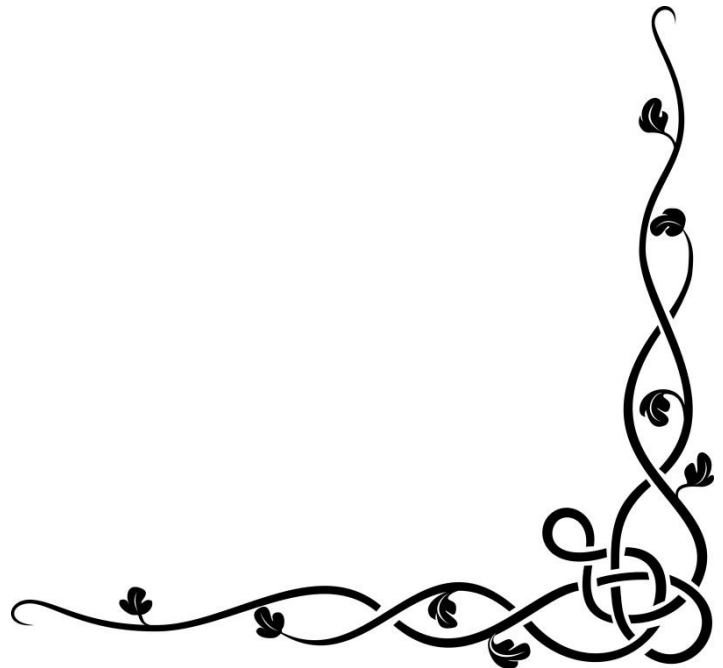
5.3.1. Expresión de marcadores osteogénicos

Los resultados de la PCR muestran que las células expresaron el gen constitutivo GAPDH pero no el gen osteoblástico CBFA-1, lo que indica que no se diferenciaron al linaje osteoblástico (Figuras 17 Y 18). Esto puede deberse a que los compuestos osteoinductores (β -glicerolfosfato, dexametasona, y ácido ascórbico) adicionados a los andamios hechos a base de PU no lograron interaccionar adecuadamente con las células impidiendo su diferenciación osteoblástica. Por tal motivo, la participación de estos andamios en la reparación ósea probablemente sea a través del proceso de osteoconducción y no de osteoinducción, lo cual debe ser corroborado con estudios que incluyan tiempos mayores de cultivo de los andamios con las células y determinación de moléculas de adhesión focal e integrinas.



6.

CONCLUSIONES



6.1. OBTENCIÓN DE CTMh

Se obtuvieron CTMh de membrana amniótica de placenta humana las cuales poseen la capacidad para diferenciarse en diferentes linajes y la capacidad de formar clonas a partir de una concentración celular, además de que expresan marcadores celulares específicos en menor proporción.

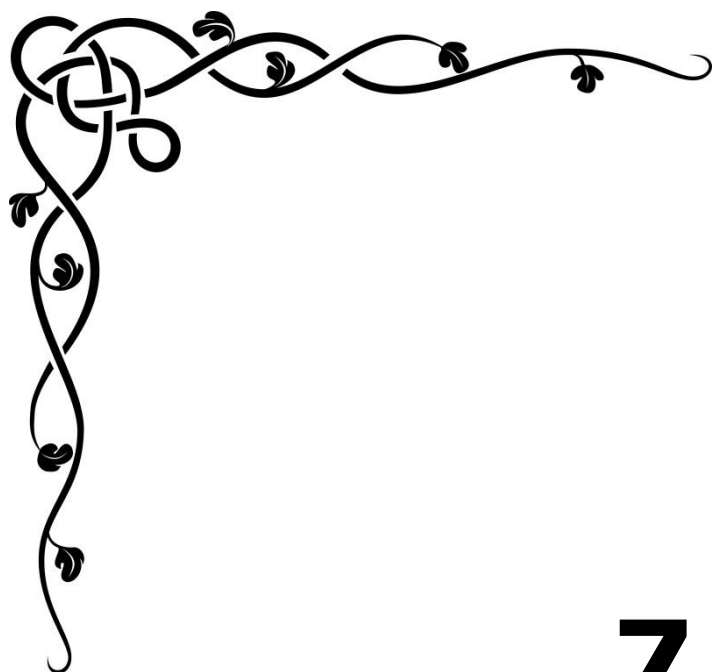
6.2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOCONDUCTOR

Los andamios sintéticos hechos a base de poliuretanos (PU) resultaron ser atóxicos, siendo los andamios 1 (PU) y 4 (PU + ácido ascórbico) los que promueven mayor proliferación. El PU por si sólo promueve una mayor proliferación celular.

El andamio 4 (PU + ácido ascórbico) promueve la adherencia de células a su superficie, mientras que en los otros andamios no se observa adherencia celular. Se proyecta realizar estudios con diferentes concentraciones de células y análisis fisicoquímicos para evaluar las propiedades de la superficie del andamio y en dado caso modificarlas para promover, además de la proliferación celular, la adhesión.

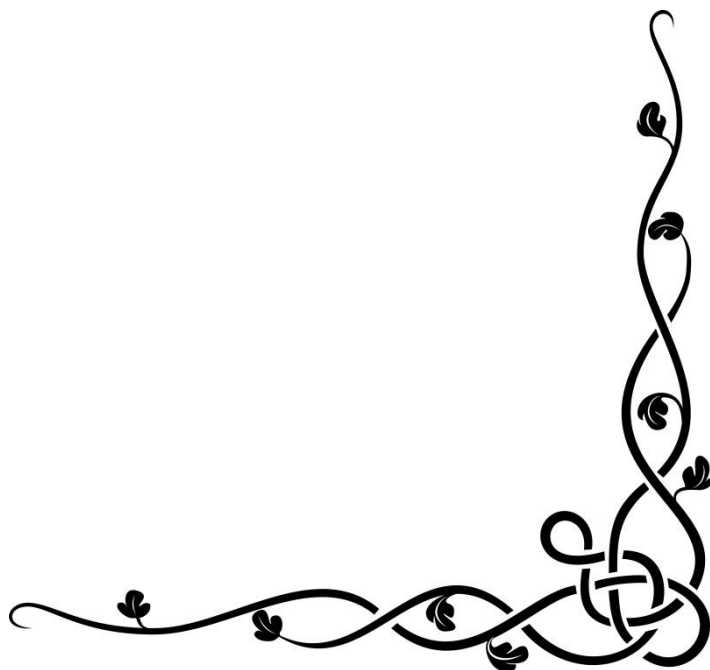
6.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL OSTEOINDUCTOR

Los andamios sintéticos hechos a base de poliuretanos (PU) no fueron capaces de inducir a las CTMh hacia el linaje osteoblástico, este efecto probablemente se deba a que los compuestos osteoinductores (β -glicerolfosfato, dexametasona, y ácido ascórbico) adicionados a PU no lograron tener su efecto en las células. Probablemente la participación de estos andamios en la reparación ósea sea a través del proceso de osteoconducción. Para ello, se deben realizar pruebas sobre el alcance que tienen los compuestos inductores de la diferenciación osteoblástica de los andamios en las células.



7.

BIBLIOGRAFÍA



- [1] Wang Q, Gu Z, Jamal S, Detamore MS, Berkland C. *Hybrid hydroxyapatite nanoparticle colloidal gels are injectable fillers for bone tissue engineering*. Tissue Engineering A 19(23–24):2586–2593, (2013).
- [2] Reyes Melo ME. *Ingeniería y biomateriales*. Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Universidad Autónoma de Nuevo León. Año XVI, 58, 3-8, (2013).
- [3] Gogolewski S. *Selected topics in biomedical polyurethanes. A review*. Colloid & Polymer Science. 267(9):757–785. (1989).
- [4] Middleton JC, Tipton AJ. *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials. 21(23):2335–2346, (2000).
- [5] Clarke B. *Normal bone anatomy and physiology*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 3:S131–S139, (2008).
- [6] Taichman RS. *Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche*. Blood 105:2631–2639, (2005).
- [7] Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. *Bone Histomorphometry*. New York: Raven Press, 1–12, (1994).

[8]. Robey PG, Boskey AL. *The biochemistry of bone*. In: Marcus R, Feldman D, Bilezikian JP, Kelsey J (eds) *Osteoporosis*. Academic Press, New York. 95–183, (1995).

[9]. Boskey AL. *Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities*. *Journal of Cellular Biochemistry*. Supplement S30–31:83–91 (1998).

[10]. Boskey AL. *Matrix proteins and mineralization: an overview*. *Connective Tissue Research* 35:357–363, (1996).

[11]. Marotti G, Cane V, Palazzini S, Palumbo C. *Structure-function relationships in the osteocyte*. *Italian Journal of Mineral and Electrolyte Metabolism* 4:93–106, (1990).

[12]. Nijweide PJ, Burger EH, Klein-Nulend J, van der Pluijm G. *The Osteocyte*. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA, 115–126, (1996).

[13] Parfitt AM. *Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone*. *Journal of Cell Biochemistry*. 55:273–286, (1994).

[14] Roodman GD. *Advances in bone biology: the osteoclast*. Endocrine Reviews 17:308–332, (1996).

[15] Einhorn TA. *Enhancement of fracture-healing*. Journal of Bone & Joint Surgery American. 77, 940–956, (1995).

[16] Einhorn TA. *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clinical Orthopaedics. (Suppl 355), S7–21, (1998).

[17] Mandracchia VJ, Nelson SC, Barp EA. *Current concepts of bone healing*. Clinics in Podiatric Medicine and Surgery. 18, 55–77, (2001).

[18] Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT. *Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair*. Journal of Biological Chemistry. 277, 30177–30182, (2002).

[19] Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. *Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation*. Journal of Cellular Biochemistry. 88, 873–884, (2003).

[20] Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. *Growth factor regulation of fracture repair*. Journal of Bone and Mineral Research. 14, 1805–1815, (1999).

[21] Hauser CJ, Zhou X, Joshi P, Cuchens MA, Kregor P, Devidas M, Kennedy RJ, Poole GV, Hughes JL. *The immune microenvironment of human fracture/soft-tissue hematomas and its relationship to systemic immunity*. Journal of Trauma 42, 895–903, (1997).

[22] Carano RAD, Filvaroff EH. *Angiogenesis and bone repair*. Drug Discovery Today. 8; 21, (2003).

[23] Potten CS, Loeffler, M. *Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt*. Development 110(4):1001–1020, (1990).

[24] Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. *The STRO-1+ marrow cell population is multipotential*. Cells Tissues Organs 170(2–3):73–82, (2002).

[25] Torensma R, ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. *Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion*. *Clinical Oral Implants Research*. 14(5):569–577, (2003).

[26] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Li H. *Current concepts in adult stem cell therapy for stroke*. *Current Medicinal Chemistry*. 13(29):3565–3574, (2006).

[27] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Li H. *The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases*. *Cell Transplant*. 16(3):273–284, (2007).

[28] Kuo TK, Ho JH, Lee OK. *Mesenchymal stem cell therapy for non-musculoskeletal diseases: Emerging applications*. *Cell Transplant*. 18(9):1013–1028, (2009).

[29] Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, Hayashi S. *Differential ability of somatic stem cells*. *Cell Transplant*. 18(5): 581–589, (2009).

[30] Seruya M, Shah A, Pedrotty D, du Laney T, Melgiri R, McKee JA, Young HE, Niklason LE. *Clonal population of adult stem cells: Life span and differentiation potential*. *Cell Transplant*. 13(2):93–101, (2004).

[31] Vayssade M, Nagel MD. *Stromal cells*. *Frontiers in Bioscience*. 14:210–224; (2009).

[32] Ouyang HW, Goh JC, Thambyah A, Teoh SH, Lee EH. *Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon*. *Tissue Engineering*. 9(3): 431–439, (2003).

[33] Hung SC, Chang CF, Ma HL, Chen TH, Low-Tone Ho L. *Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells*. *Gene* 340(1):141– 150, (2004).

[34] Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. *Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality*. *Stem Cells* 20(6):530–541, (2002).

[35] Huang CY, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung HS. *Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells*. *Stem Cells* 22(3):313–323, (2004).

[36] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell 89(5):747–754, (1997).

[37] Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell 89(5):755–764, (1997).

[38] Hofmann A, Ritz U, Verrier S, Eglin D, Alini M, Fuchs S, Kirkpatrick CJ, Rommens PM. *The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds*. Biomaterials 29; 4217–4226, (2008).

[39] Leschke MW, Strohe A, Scheuer S, Eglin D, Verrier S, Alini M, Pohlemann T, Menger MD. *In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering*. Acta Biomaterialia. 5; 1991–2001, (2009).

[40] Janik H, Marzec M. *A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds*. Materials Science and Engineering. C 48; 586–591, (2015).

[41] Kucinska-Lipka J, Gubanska I, Janik H, Sienkiewicz M. *Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system*. Materials Science and Engineering. C 46; 166–176, (2015).

[42] Guelcher SA, Srinivasan A, Dumas JE, Didier JE, McBride S, Hollinger JO. *Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates*. Biomaterials 29; 1762–1775, (2008).

[43] Gorna K, Gogolewski S. *Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders*. Journal of Biomedical Materials Research. 60; 592–606, (2002).

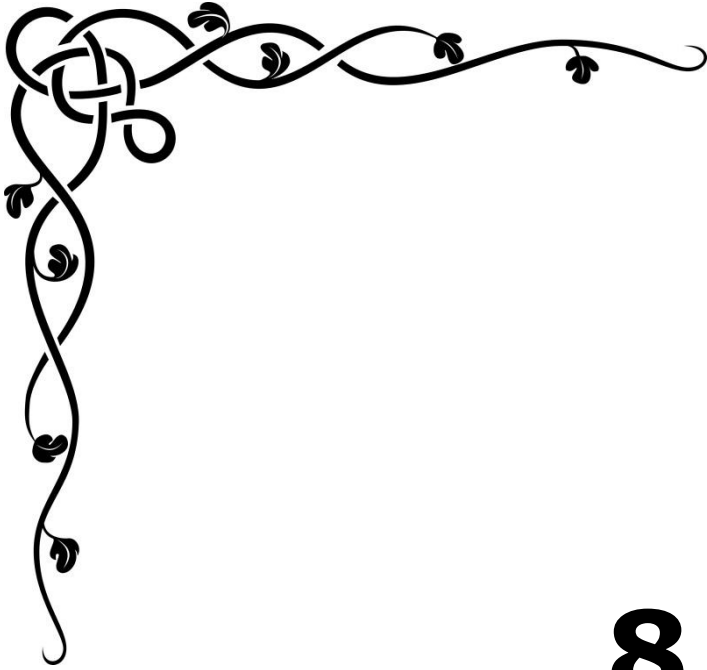
[44] Joshi RR, Underwood T, Frautschi JR. *Calcification of polyurethanes implanted subdermally in rats is enhanced by calciphylaxis*. Journal of Biomedical Materials Research. 31; 201–207, (1996).

[45] Kavanaugh TE, Clark AY, Chan-Chan LH, Ramírez-Saldaña M, Vargas-Coronado RF, Cervantes-Uc JM, Hernández-Sánchez F, García AJ, Cauch-Rodríguez JV. *Human mesenchymal stem cell behavior on segmented polyurethanes prepared with biologically active chain extenders*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 27-38, (2016).

[46] Rodríguez-Fuentes N, Rodríguez-Hernández AG, Enríquez-Jiménez J, Alcántara-Quintana LE, Fuentes-Mera L, Piña-Barba MC, Zepeda-Rodríguez A, Ambrosio JR. *Nukbone® promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane*. Biochemical and Biophysical Research Communications 434; 676–680 (2013).

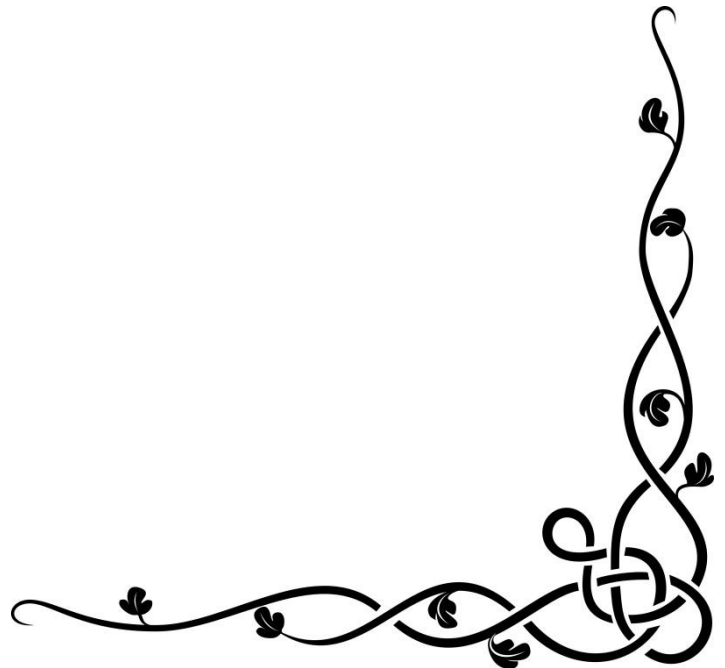
[47] Seebach C, Schultheiss J, Wilhelm K, Frank J, Henrich D. *Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro*. Injury, International Journal of the Care of the Injured. 41: 731-738, (2010).

[48] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy* 8(4); 315-317, (2006).




8.

ANEXOS



8.1 CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

SALUD  HOSPITAL GENERAL de MEXICO

ANEXO IV
HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

No.: Lote 1

Fecha de llenado: 17/Jun/16

Siglas del paciente: GDB No. Expediente: 157613

Edad: 24

Antecedentes Personales Patológicos:

DM2 Sí No HAS Sí No

LES Sí No TOXICOMANIAS Sí No específica: _____

ETS Sí No específica: _____

Antecedentes Ginecobstétricos:

Gestas: 3 Paras: _____ Cesáreas: 2 Abortos: _____

Semanas de Gestación: 38 Embarazo normoevolutivo: Sí No

FUM: 25/09/15

Datos placentarios:

Obtención: parto cesárea Hora de alumbramiento: 01 20

Fecha de toma de tejido placentario: 17/Jun/16

Causa de indicación de cesárea: Pandula satisfecha, cesárea KerrTOTB, litrativa

Contaminación del producto Sí No

Yo Beatriz Adriana Galvan Dávalos acepto donar 5cm de mi placenta para la investigación Exerto de la matriz o sea vagina sobre la diferenciación de células madre

Beatriz 17/06/16

ANEXO IV

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

No. : Lote 2

Fecha de llenado: 29/07/16

Siglas del paciente: RAS

No. Expediente: _____

Edad: 40^a

Antecedentes Personales Patológicos:

DM2 Sí No HAS Sí No
 LES Sí No TOXICOMANIAS Sí No especifica: _____
 ETS Sí No especifica: _____


Antecedentes Ginecobstétricos:

Gestas: 3 Paras: 0 Cesáreas: 2 Abortos: 0
 Semanas de Gestación: 38 Embarazo normoevolutivo: Sí No
 FUM: 04/10/15

Datos placentarios:

Obtención: parto cesárea Hora de alumbramiento: 9 10 am
 Fecha de toma de tejido placentario: 29/07/16
 Causa de indicación de cesárea: Embarazo de 38sde + Colera Heráclida Unidad de Salud
 Contaminación del producto: Sí No

Yo Sofía Romero Alfonso acepto donar una muestra de 5cm de mi placenta para fines de investigación, con la plena información de el fin de mi tejido, el proyecto efecto de la matriz osea bovina sobre la diferenciación de células madre


Sofía Romero Alfonso
 29/07/16

HOSPITAL GENERAL DE ZONA

Dr. Salvador González Herrejon

Proyecto: Organización del citoesqueleto de F- actina en células troncales mesenquimales y su visualización en el proceso de cultivo mediante la expresión de actina fluorescente en células transfectadas

No.: 156907 Lote #

Fecha de llenado: 21/Sept/16

Siglas del paciente: MOR

No. Expediente: 156907

Edad: 30a

Antecedentes Personales Patológicos:

DM2 Sí No HAS Sí No

LES Sí No TOXICOMANIAS Sí No especifica: -

ETS Sí No especifica: -

Antecedentes Ginecobstétricos:

Gestas: 1 Paras: 0 Cesáreas: 0 Abortos: 0

Semanas de Gestación: 39.4 Embarazo normoevolutivo: Sí No

FUM: 15/enero/15

Datos placentarios:

Obtención: parto cesárea Hora de alumbramiento: 10.45

Hora de toma de muestra: 10.50

Hora de procesamiento de muestra:

Fecha de toma de tejido placentario: 21/Sept/16 Contaminación del producto: Sí No (Líquido amniótico con ligero tinte mecánico)

- Rh (+)
- Tinte mecánico
- con inicio de trabajo de parto, contracciones

Vb María del Rocío Mancera acepta participar con la obtención de un segmento de mi placenta con fines de investigación.

8.2 CARTA DEL COMITÉ DE ÉTICA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA
OFICIO NO. FMED/CI/JMO/003/2013

ASUNTO: Dictamen del Proyecto 101/2012

DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ
Profesor Titular "B" TC
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina
Presente.

Estimado Dr. Ambrosio Hernández:

Me complace informarle que su proyecto número 101-2012 "Efecto de la matriz ósea bovina sobre la diferenciación de células madre mesenquimales a osteoblastos" ha sido **APROBADO** por las Comisiones de Investigación y Ética de esta Facultad de Medicina, en su sesión ordinaria de fecha 04 de diciembre de 2012; sujetándose, tal y como está descrito, a los estudios *in vitro*. Esta aprobación no implica de ninguna forma, la autorización para llevar a efecto estudios clínicos en humanos.

Para conocer el seguimiento de esta investigación, es necesario que entregue un informe anual, en la División de Investigación, tomando en cuenta esta fecha de elaboración del dictamen.

Asimismo, le solicitamos atentamente nos envíe una copia del o los artículos y/o copia de la carátula y resumen de las tesis que pudieran generarse relacionadas con el proyecto.

La vigencia de este dictamen es de 3 años a partir de la fecha de la aprobación.

Sin otro particular de momento, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 08 de enero de 2013.

EL SECRETARIO TÉCNICO

DR. JAIME MAS OLIVA