



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

**“CITOCOMPATIBILIDAD DE CONSTRUCTO DE INGENIERÍA DE
TEJIDOS ELABORADO CON PLA Y CÉLULAS TRONCALES”.**

TESIS

Que para obtener el título de:

CIRUJANO DENTISTA

Presenta:

ACEVES JIMÉNEZ ANA LAURA

Directora de Tesis:

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Sinodales:

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Dra. Janeth Serrano Bello

Dr. Alejandro García Muñoz

Dr. José Francisco Gómez Clavel



Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de
Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IA201814 y al
Proyecto de CONACYT CB201401 #0235984.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2018.



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.

AGRADECIMIENTOS A COLABORADORES E INSTITUCIONES.

Mi agradecimiento por el apoyo recibido a la Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte perteneciente al Laboratorio de Investigación Odontológica de la FESI que ejerció como mi tutora para la realización de esta tesis como parte de mi formación como profesional, por el conocimiento adquirido, motivación, su paciencia y amistad.

Agradezco al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, UNAM por conceder el andamio de ácido poli-láctico (PLA). Al igual que al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez, responsable de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la FES Cuautitlán CAMPO-4 por las facilidades otorgadas para la realización de los procedimientos experimentales en esta tesis.

Agradezco a la Dra. María Rosa Ávila Costa por el apoyo en la toma de fotografías en el microscopio electrónico de barrido ubicado en el Laboratorio de Nacional de FESI. También a la Dra. Leticia Moreno encargada del microscopio de fluorescencia por el uso del microscopio ubicado en la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED) de la FESI.

Mi agradecimiento al Dr. José Francisco Gómez Clavel perteneciente al Laboratorio de Investigación en Educación y Odontología por el uso del microscopio óptico para la toma de fotografías y al Dr. German Isauro Garrido Fariña por el apoyo en el área histológica, responsable del Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología de la FES Cuautitlán.

También mi agradecimiento por el apoyo en la redacción de la presente tesis a mis sinodales, la Dra. Janeth Serrano Bello perteneciente al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, UNAM, al Dr. Alejandro García Muñoz perteneciente al Laboratorio de Investigación Odontológica de la FESI y los doctores Dr. Gómez Clavel y al Dr. Álvarez Pérez.

Por último agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido a través de la beca 26254.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

El mayor agradecimiento es para mis padres los cuales me han otorgado el apoyo necesario para que yo estudie, por enseñarme a ser una persona responsable, amigable y respetuosa, por apoyarme en todo el proceso el cual ha sido muy largo, pero que hoy se ve culminado. Por el apoyo en todos los momentos buenos pero en especial en aquellos que fueron muy difíciles, en los que quería rendirme pero ustedes junto a mis hermanos no permitieron que me derrumbara, porque siempre han buscado hacer de mí una persona de bien. Gracias a su apoyo desde el inicio de mi formación he logrado superar obstáculos y aprender de ellos, haciéndome una persona más fuerte y capaz de afrontar dificultades. Gracias a ustedes familia hoy he logrado culminar una etapa más.

Te agradezco Ale que me hayas apoyado en este proceso de la tesis, por ser tan responsable, buena amiga y tan paciente, gracias a eso el proceso ha sido más fácil, por los buenos momentos en el laboratorio y todas las cosas graciosas que nos pasaron. A mis compañeros Mario e Israel por también apoyarme y a las graciosas conversaciones, aunque muchas veces ustedes dos me sacaban canas verdes bueno aún lo siguen haciendo, gracias a los tres por el apoyo. También agradecer a mis primeros maestros en el laboratorio Javi, Rouss, Rocío y Eve por las enseñanzas y los buenos momentos.

Gracias a todos ustedes hoy supero una etapa más en mi vida.

Contenido

1	ABREVIATURAS	6
2	RESUMEN.....	8
3	INTRODUCCIÓN.....	10
3.1	Ingeniería de Tejidos.....	10
3.1.1	Ingeniería de Tejidos Óseos y constructos.	11
3.2	Biocompatibilidad de un biomaterial y la citocompatibilidad.....	12
3.2.1	Tipos de biomateriales usados en la Ingeniería de Tejidos.....	13
3.2.2	Ácido poli-láctico (PLA).	15
3.3	Células troncales mesenquimales del tejido adulto (MSCs).....	19
3.3.1	Tejido adiposo.....	19
3.3.2	Células troncales mesenquimales de tejido adiposo (MSCat).....	21
4	JUSTIFICACIÓN.....	24
5	ANTECEDENTES.....	25
6	HIPÓTESIS.....	28
7	OBJETIVOS.....	29
8	METODOLOGÍA	30
8.1	Andamio de PLA.	31
8.1.1	Acondicionamiento del PLA antes de su uso.....	31
8.1.2	Degradación <i>in vitro</i> del PLA.	32
8.2	Diseño experimental de estudios <i>in vitro</i>	33
	Cultivos de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo indiferenciadas (MSCat).....	33
	Cultivos de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo inducidas a la diferenciación osteogénica (MSCost).....	33
	Cultivos de fibroblastos inducidos a la diferenciación osteogénica (Fbost).	33
8.3	Extracción de piel para obtenidos de cultivo de fibroblastos.	34
8.3.1	Obtención de células de fibroblastos (Fb) y su expansión.	35
8.4	Extracción del tejido adiposo.	36
8.4.1	Obtención de Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo (MSCat) y su expansión.	37

8.5 Subcultivos.....	39
8.6 Cuantificación con cámara de Neubauer.....	39
8.7 Técnica de sembrado.....	40
8.8 Diferenciación al linaje osteogénico.....	41
8.9 Fijación celular.....	42
8.10 Inmunofluorescencia.....	43
8.11 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	45
8.12 Degradación <i>in vivo</i> del PLA.....	46
9 RESULTADOS.....	48
9.1 Degradación <i>in vitro</i> de PLA.....	48
9.2 Aislamiento de cultivo de MSCat.....	51
9.2.1 Características del cultivo.....	52
9.2.2 Rendimiento del cultivo.....	54
9.2.3 Diferenciación osteogénica.....	55
9.4 Inmunofluorescencia.....	59
9.5 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	61
9.6 Degradación <i>in vivo</i> de PLA.....	63
10 DISCUSIÓN.....	64
11 CONCLUSIONES.....	68
12 BIBLIOGRAFIA.....	69
13 CONTENIDO DE FIGURAS.....	73
14 ANEXOS.....	75

1 ABREVIATURAS.

ALP: Fosfatasa Alcalina (Alkaline Phosphatase).

ASA: Ácido Acetilsalicílico (Acetylsalicylic Acid).

BMP: Proteína Morfogenética Ósea (Bone Morphogenetic Protein).

BMSCs: Células Estromales de Médula Ósea (Bone Marrow Stromal Cells).

BSA: Albúmina de Suero Bovino (Bovine Serum Albumin).

Col 1: Colágeno tipo 1.

CS: Silicato de Calcio (Calcium Silicate).

D/MEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMSO: Dimetilsulfóxido (Dimethyl Sulfoxide).

Fb: Fibroblasto.

Fbost: Fibroblasto inducido con medio osteogénico.

FBS: Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum).

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration).

HBSS: Solución Salina Equilibrada de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution).

HyE: Hematoxilina y Eosina.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellulary Therapy).

IT: Ingeniería de Tejidos (Tissue Engineering).

ITO: Ingeniería de Tejidos Óseos (Bone Tissue Engineering).

MEB: Microscopia Electrónica de Barrido.

M.O.: Medio Osteogénico.

MSCat: Células Troncales Mesenquimales del Tejido Adiposo (Mesenchymal Stem Cell Adipose tissue derived).

MSCost: Células Troncales Mesenquimales del Tejido Adiposo inducidas con medio osteogénico.

MSCs: Células Troncales Mesenquimales del Tejido Adulto (Mesenchymal Stem Cells).

MTT: (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 (3-carboximeononfenol) -2- (4 -sulfofenil) -2H-tetrazolio).

Mw: Peso molecular.

Oc: Osteocelcina (Osteocalcin).

On: Osteonectina (Osteonectin).

Op: Osteopontina (Osteopontin).

Osx: Osterix.

PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato (Phosphate Buffered Saline).

PDLSCs: Células del Ligamento Periodontal (Periodontal Ligament Cells).

PGA: Ácido Poli-Glicólico (Polyglycolic Acid).

PLA: Ácido Poliláctico (Poly-Lactic Acid).

PLC: Caprolactona (Polycaprolactone).

PLGA: Ácido Poli-Láctico-co-Glicólico (Poly Lactic-co-Glycolic Acid).

SHED: Dientes humanos de la primera dentición.

UV: Ultravioleta (Ultra-Violet).

2 RESUMEN

Introducción. La regeneración de defectos óseos es un reto clínico en el área de la odontológica, por ello, la Ingeniería de Tejidos propone la realización de constructos tridimensionales que promuevan la regeneración ósea, los cuales requieren de tres herramientas básicas: andamios, células y moléculas de señalización. Como andamio utilizamos el ácido poli-láctico (PLA) ya que es un material biocompatible, bioabsorbible y altamente poroso. Utilizamos células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (MSCat) debido a su alta capacidad de auto-renovación, proliferación y diferenciación ósea; y como señalización implementamos el uso de D/MEM suplementado para dirigir la diferenciación de las MSCat al linaje óseo.

Objetivo: Evaluar la citocompatibilidad de un constructo de Ingeniería de Tejidos Óseos, elaborado con un andamio de PLA y MSCat diferenciadas al linaje osteogénico.

Metodología. Este trabajo se realizó con la aprobación de los Comités de Ética (Folio: 1211) y Bioseguridad (Folio: 071) de la FES Iztacala. Se realizaron pruebas de degradación del PLA *in vitro* e *in vivo*; para ello, empleamos un total de 8 ratas Wistar macho a las que se les realizaron biopsias de tejido adiposo subcutáneo y de piel para el aislamiento de cultivos primarios de MSCat y Fibroblastos (Fb). Nuestros grupos experimentales fueron: MSCat y MSCost (MSCat inducidas a la diferenciación osteogénica) y como control empleamos: Fb y Fbost (FB inducidos a la diferenciación osteogénica). Para realizar los constructos 10^4 células fueron sembradas en los andamios de PLA (10 gr de PLA, 75ml de cloroformo y 25 ml de etanol) hechos mediante la técnica de electrohilado. Los constructos se mantuvieron bajo condiciones estándares de cultivo con D/MEM basal, medio osteogénico (MO) y MO+aspirina (ASA) respectivamente durante 14 días. Pasado ese tiempo se fijaron y se realizaron técnicas de inmunofluorescencia y microscopía electrónica de barrido (MEB).

Resultados. *In vitro*, en las pruebas de degradación a los 14 días, el PLA se mantuvo estable. En el análisis de MEB sobre la superficie del PLA, las MSCat se mostraron adheridas y distribuidas formando colonias y formaron una matriz extracelular con características de mineralizada; mediante la inmunofluorescencia observamos que las MSCat se diferenciaron mostrándose Osteocalcina positiva. *In vivo*, los constructos se integraron al tejido subcutáneo, siendo bien tolerados por el organismo e integrándose, el PLA se mantuvo estable.

Conclusión. El constructo realizado con PLA, MSCat y M.O. resultó citocompatible y las células en el andamio se diferenciaron al linaje osteogénico y mostró propiedades de osteoconducción en *in vitro*, y durante las pruebas *in vivo* se integró al tejido, por lo que podría funcionar como un candidato óptimo para su uso en la regeneración ósea.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Ingeniería de Tejidos.

La Ingeniería de Tejidos (IT), es definida como el conjunto de herramientas utilizadas para la creación de implantes similares a tejidos con características similares a las fisiológicas, capaces de conducir e inducir a la regeneración de un tejido específico, que ha sido lesionado o perdido por diversas causas, como son: traumatismos, infecciones, alteraciones hormonales, genéticas o neoplasias, que pueden establecer una pérdida del tejido que supera la capacidad de respuesta regenerativa. Por ello, se han empleado diferentes sustitutos para la regeneración de tejido como: injertos, biomateriales, etcétera (Alvarez Barreto, 2009).

El uso de los biomateriales como andamios es la opción equivalente al uso de auto-injertos, ya que mediante sus propiedades osteoconductoras mejoran la función o reparación del tejido óseo al rellenar defectos, acortar distancias y/o cubrir heridas (Melek, 2015).

La regeneración de los tejidos es un proceso complejo que incluye tres etapas que son: la inflamación, proliferación y remodelación. Durante este proceso las señales biológicas logran el aumento en el número de células que llenan el defecto o cubren la herida. Al mismo tiempo, la especialización del tejido recién formado se produce a través de señales morfogénicas que inducen a la diferenciación específica de las células del tejido. Así, de esta manera, las células y las moléculas de señalización están estrechamente vinculadas y forman la base de la homeostasis de los tejidos y la regeneración *in vivo* (Melek, 2015).

Una de las técnicas quirúrgicas para promover la regeneración es el uso de la terapia celular, ya que proporciona numerosos beneficios incluyendo una disminución en la morbilidad del sitio donante y menos riesgos de complicaciones en el procedimiento de reparación. En particular, las células troncales mesenquimales (MSCs) ha mostrado un gran potencial para su uso terapéutico en Ingeniería de Tejidos Óseos (ITO) debido a su capacidad de osteoinducción, inmunomodulación y de promover la regeneración (Kim, 2016), (Rai, 2015).

3.1.1 Ingeniería de Tejidos Óseos y constructos.

La ITO que propone que para regenerar nuevos tejidos dentro de un ambiente específico, como es el hueso, se requieren de tres herramientas básicas: andamios, células y moléculas de señalización, con el objetivo de diseñar constructos tridimensionales que actúen como una matriz extracelular osteoconductora, permiten rellenar el espacio que dejó el tejido dañado hasta que esté sea regenerado por completo, y por ello, la función principal de un constructo es sustituir temporalmente las funciones de los tejidos y servir como guía para el crecimiento de nuevos tejidos a fin de devolverles su forma y función, y al mismo tiempo que son reabsorbidos por el propio tejido del huésped (figura 1) (Perán, 2013). Estudios han demostrado que los constructos pueden ser una gran promesa para la regeneración con historias exitosas (Melek, 2015), (Shen, 2016), (Tajbakhsh, 2017).

En la ITO un constructo debe poseer de tres características importantes: osteoconducción, osteoinducción, capacidad de promover la osteogénesis. La osteoconducción se refiere a la capacidad de un material de servir de andamio para que las células puedan desplazarse dentro y a través de él. La osteoinducción es la capacidad de producir la estimulación adecuada para la activación de células osteoprogenitoras del tejido circundante; y la capacidad de promover el proceso de osteogénesis, que es la formación de hueso nuevo por las células osteoprogenitoras dentro del constructo y también las del huésped (Matsuno, 2010).

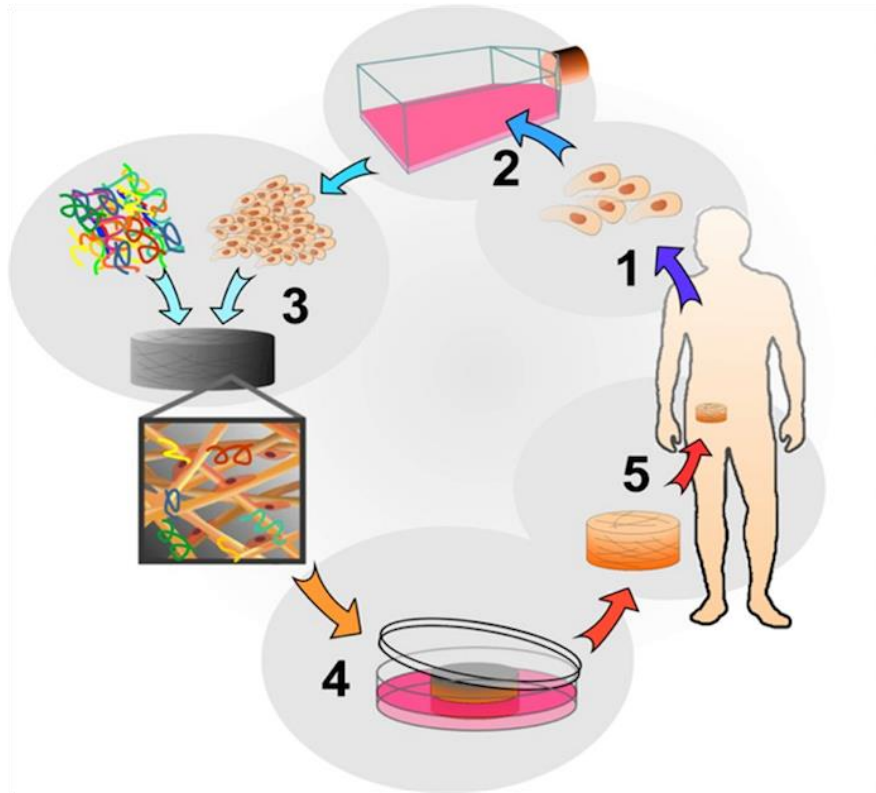


Figura 1: Esquema de la Ingeniería de Tejidos, tomado de la página de CONACyT.

3.2 Biocompatibilidad de un biomaterial y la citocompatibilidad.

Se le denomina “biomaterial” a los materiales que en contacto con los tejidos y/o fluidos biológicos no producen en ellos ningún tipo de alteración; es decir, que sean biocompatibles; y son empleados para reproducir la función de los tejidos de forma segura, mecánicamente funcional y fisiológicamente aceptable.

La biocompatibilidad en un biomaterial, andamio o constructo se define como: su capacidad de conducir o no a la formación de una reacción inflamatoria intolerable que no es proporcional a su ventaja. La biocompatibilidad de los biomateriales depende de factores intrínsecos relacionados con el material en sí, y factores extrínsecos dependientes del huésped y del sitio de implante (véase tabla 1) (Ramot, 2016). Proponiendo así como definición de citocompatibilidad: la

capacidad del biomaterial de ser tolerado por las células que le son sembradas sin causarles muerte, apoptosis y/o deformaciones.

Tabla 1: Factores intrínsecos y extrínsecos de la aplicación de un biomaterial.

Factores intrínsecos	Factores extrínsecos
Forma.	Huésped.
Tamaño.	Herencia genética.
Porosidad.	Lugar de implantación.
Composición.	Microambiente.
Superficie química.	
Esterilidad.	
Rugosidad.	
Degradación.	
Diseño.	

3.2.1 Tipos de biomateriales usados en la Ingeniería de Tejidos.

Los biomateriales pueden ser de uso temporal o permanentemente cuando son implantados en el cuerpo y tratan de restaurar el defecto existente para, en algunos casos, conseguir la regeneración. Entre los distintos biomateriales se encuentran: los metales, cerámicas, vidrios, acero y otras aleaciones metálicas; también existen los polímeros sintéticos de múltiples clases, polímeros naturales, tejidos biológicos modificados, etc. (figura 2) (Lizarbe, 2007).

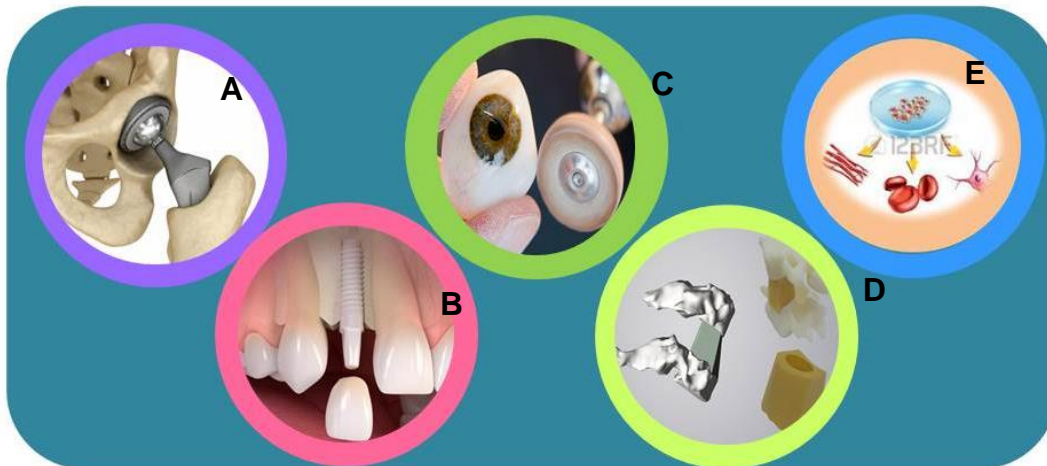


Figura 2: Esquema de biomateriales usados en la Ingeniería de Tejidos: A) metales; B) cerámicas; C) vidrios; D) polímeros; E) tejidos biológicos modificados.

Los andamios naturales o sintéticos, han sido probados con el fin de producir un andamiaje clínicamente útil de un tejido u órgano diana; ejemplos de uso de andamios que se han aplicado clínicamente, incluyen: dermis para tratar las lesiones por quemaduras (Sakamoto, 2017) (Guzman-Uribe, 2017), biomateriales para intestino delgado (Syed, 2014) o uréter (Xu, 2015) (Zhang, 2015), entre otros.

Entre los diferentes tipos de andamios existen, los polímeros naturales y sintéticos. Los polímeros naturales más comúnmente utilizados son: la matriz ósea desmineralizada, agarosa, colágeno, membrana basal, alginato, entre otros; y entre los polímeros sintéticos: ácido poli-glicólico (PGA), ácido poli-láctico (PLA) y sus copolímeros, ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) y caprolactona (PLC), etcétera (Perán, 2013).

3.2.2 Ácido poli-láctico (PLA).

Uno de los biomateriales que sirve de apoyo a la regeneración ósea es el ácido poli-láctico (PLA), con él que podemos elaborar andamios en los que se depositen las células progenitoras con el objetivo de que estas se diferencien y favorezcan la osteogénesis para el crecimiento y mineralización de la matriz ósea.

El PLA fue descubierto en 1845 por Pelouze quien condensó el ácido láctico por medio de una destilación con agua para formar PLA de bajo peso molecular y un dímero cíclico del ácido láctico (Farah, 2016). En la década de 1960, para aplicaciones médicas el PLA se utilizó como suturas y varillas para la reparación de fracturas mandibulares en perros (Tyler, 2016). Desde la década de 1970, los productos PLA fueron aprobados por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) para el contacto directo con fluidos biológicos (Xiao, 2012).

El PLA es un polímero de ácido láctico o 2 ácidos hidroxipropanoico que pertenece a la familia de los poliésteres alifáticos, a menudo son fabricados a partir de alfa-hidroxiácidos y que son considerados biodegradables (Ramot, 2016), (Tajbakhsh, 2017).

El PLA es un agente biodegradable, termoplástico que se obtiene como un producto de la fermentación del almidón de las plantas como: maíz, caña de azúcar, papas y betabel (Tsou, 2015). El polímero, es luego sintetizado por condensación directa de ácido usando un catalizador. Recientemente, se ha informado de procedimientos de síntesis enzimática utilizando lipasas para la producción de PLA, eliminando el uso de catalizadores metálicos, por lo que es fácil de sintetizar y su proceso de obtención es amigable con el medio ambiente (figura 3) (Saini, 2016).

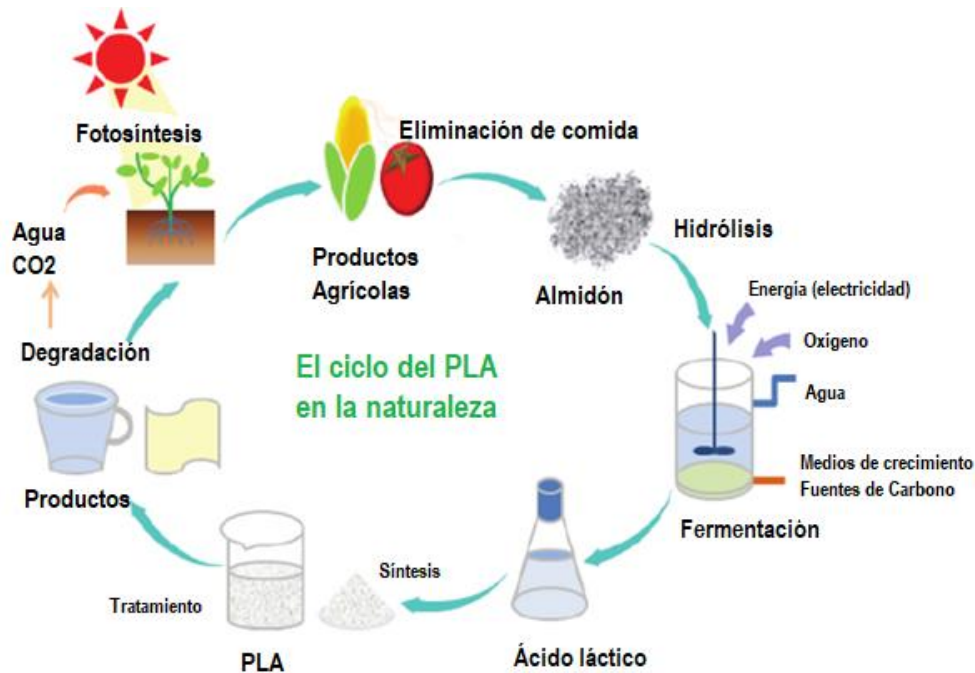


Figura 3: Esquema del ciclo del PLA en el medio ambiente como: la fermentación, la síntesis, el tratamiento y degradación (Xiao, 2012).

El PLA contiene dos estereoisómeros de ácido láctico, de los isómeros L+ o D-láctico y una modificación racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L+ y D-. A diferencia del isómero D-, la configuración L+ es metabolizada por el organismo humano, por lo que es la que se usa para la fabricación de dispositivos biomédicos (Serna, 2011).

Las ventajas que presenta el PLA y que lo hacen un biomaterial atractivo son: ser biocompatible, procesabilidad sencilla, el ahorro energético cuando esté es procesado y es un excelente material para aplicaciones biomédicas ya que no es tóxico ni cancerígeno para el cuerpo humano con numerosas aplicaciones biomédicas como: stents, suturas quirúrgicas, placas y tornillos para la fijación cráneo-maxilofacial, tornillos de interferencia en el tobillo, la rodilla y la mano; clavos y pernos para la fijación de ligamentos, anclas, implantes de tejidos blandos, andamios de IT, dispositivos de administración de fármacos y aumentos cráneo-faciales en cirugía plástica, entre otros (Farah, 2016).

El PLA se puede procesar por diferentes métodos, entre ellos: fundición de película, extrusión, moldeo por soplado, hilado de fibras e impresión 3D (Xiao, 2012). La técnica de electrohilado o electrospinning es una técnica que permite la creación de micro y nanofibras a través de un chorro de solución polimérica eléctricamente cargada. Los andamios producidos por electrohilado son herramientas muy atractivas para la IT, dado que imitan a la una matriz extracelular, y es por ello que estos andamios actúan como buenos soportes para la adhesión y desarrollo celular (figura 4) (Sabino, 2017), (Tajbakhsh, 2017).

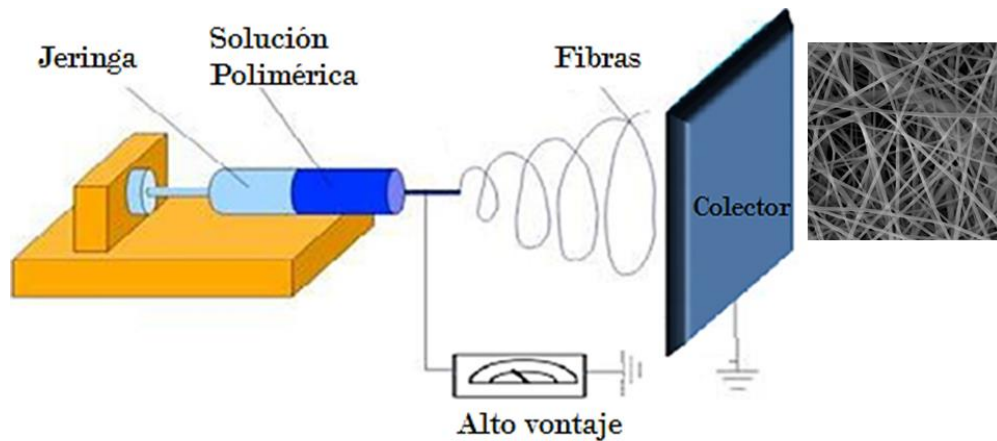


Figura 4: Esquema del procedimiento de electrohilado (Gupta, 2014).

La degradación del PLA se produce principalmente por hidrólisis, después de varios meses de exposición a la humedad y se produce en dos etapas, primero, la escisión de la cadena no enzimática de los grupos éster que conduce a una reducción en peso molecular (Mw) y en la segunda etapa, el Mw se reduce hasta que el ácido láctico y oligómeros de bajo Mw son naturalmente metabolizados por las células para producir dióxido de carbono y agua. El PLA puede tardar en degradarse desde 10 meses a 4 años, dependiendo de los factores del microambiente que lo rodeen, de su diseño, porosidad y la cristalinidad, así como de con que otros biomateriales sea combinado. El PLA es usado en la IT, ya que soporta bien los procesos de esterilización, especialmente, de la esterilización gamma, con hielo seco, la esterilización química por los gases como el óxido de etileno y el empleo de luz UV (Farah, 2016).

El PLA para su uso específico como andamio en tejidos óseos, debe cumplir con ciertas características como (Tajbakhsh, 2017):

- ✓ Ser tridimensional y altamente poroso en su estructura, con una red interconectada para el crecimiento celular y el flujo de transporte de nutrientes y residuos metabólicos.
- ✓ Ser biocompatible y bioabsorbible.
- ✓ Poseer una superficie químicamente adecuada para la fijación celular, la proliferación y la diferenciación.
- ✓ Poseer propiedades mecánicas adecuadas para que coincidan con los de los tejidos en el sitio de implantación.

Todas las características antes mencionadas tienen por objetivo que el PLA muestre propiedades de citocompatibilidad.

3.3 Células troncales mesenquimales del tejido adulto (MSCs).

Las células troncales mesenquimales del tejido adulto (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) se caracterizan por su habilidad para la proliferación, auto-renovación y diferenciación hacia múltiples líneas celulares (Meruane, 2011). Las primeras MSCs fueron identificadas por primera vez en la médula ósea (BMSCs) (Friedenstein, 1974) quienes encontraron una población de células troncales no hematopoyéticas en la médula ósea y observaron que las células eran adherentes, fusiformes y capaces de formar colonias derivadas de células individuales (Hu, 2018). A las MSCs se les considera multipotenciales con auto-renovación ilimitada y con capacidad de dar origen a tejidos de la misma capa embrionaria, aunque existen publicaciones actuales, que han demostrado que son capaces de diferenciarse a tejidos de otro origen embrionario, y por ello se consideran también como pluripotenciales, ya que han expresado los genes clave de pluripotencia: OCT4, SOX2, NANOG y REX1 (Meruane, 2011).

3.3.1 Tejido adiposo.

El tejido adiposo ha sido tradicionalmente considerado como un órgano de almacenamiento de energía compuesto por adipocitos maduros, que se encuentran distribuidos en distintas áreas en el organismo (figura 5). Además, se distinguen dos grandes tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo, en la tabla 2 se muestran las características principales del tejido adiposo (Moreno-Aliaga, 2002).

El tejido adiposo subcutáneo es un tejido abundante, que puede ser fácilmente extraído por métodos poco invasivos, se deriva del mesénquima y contiene una población de células troncales mesenquimales de tejido adiposo (MSCat), las cuales pueden ser aisladas en grandes cantidades mostrando un crecimiento estable en cultivo (Zuk, 2002).

Tabla 2: Principales diferencias entre grasa blanca y grasa parda (modificado de Fruhbeck et al., 2009).

Características	Grasa blanca	Grasa parda
Localización principal	Subcutánea, abdominal, inguinal, peri-renal, retroperitoneal, gonadal.	Interescapular (bebés), axilar, perineal, paravertebral, cervical, dispersa en arterias y alrededor de órganos.
Color	Blanca, amarillenta, marfil.	Marrón, rojo variable a rosada.
Vascularización	Vascularizada.	Muy vascularizada.

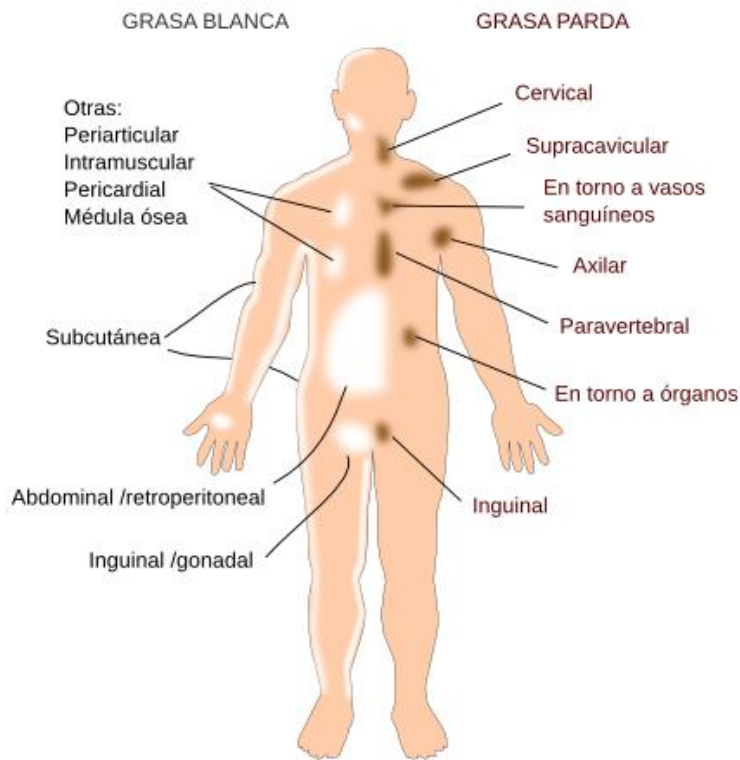


Figura 5: Esquema de la distribución de grasa blanca y parda (modificado de Gesta y cols. 2007).

3.3.2 Células troncales mesenquimales de tejido adiposo (MSCat).

Las MSCat son fáciles de aislar, expandir y cuentan con gran capacidad de diferenciación, se ha publicado que tienen la capacidad de diferenciarse a la línea: **adipogénica** (Yamachika, 2013), (Hu, 2018), (Salehi, 2017), (Rodríguez-Pardo, 2010), **osteogénica** (Tajbakhsh, 2017), (Hu, 2018), (Melek, 2015), (Yamachika, 2013) , (Salehi, 2017), (Rodríguez-Pardo, 2010), **condrogénica** (Melek, 2015), (Yamachika, 2013), (Rodríguez-Pardo, 2010), **neurogénica** (Bianchi de Di Rasio, 2004) y **miogénica** (Zuk, 2002) *en in vitro* e *in vivo*, por lo que las MSCat representan un medio importante en la IT (figura 6). Además, se ha demostrado que las MSCat parecen ser genéticamente más estables en cultivos a largo plazo en comparación con BMSCs (Hu, 2018).

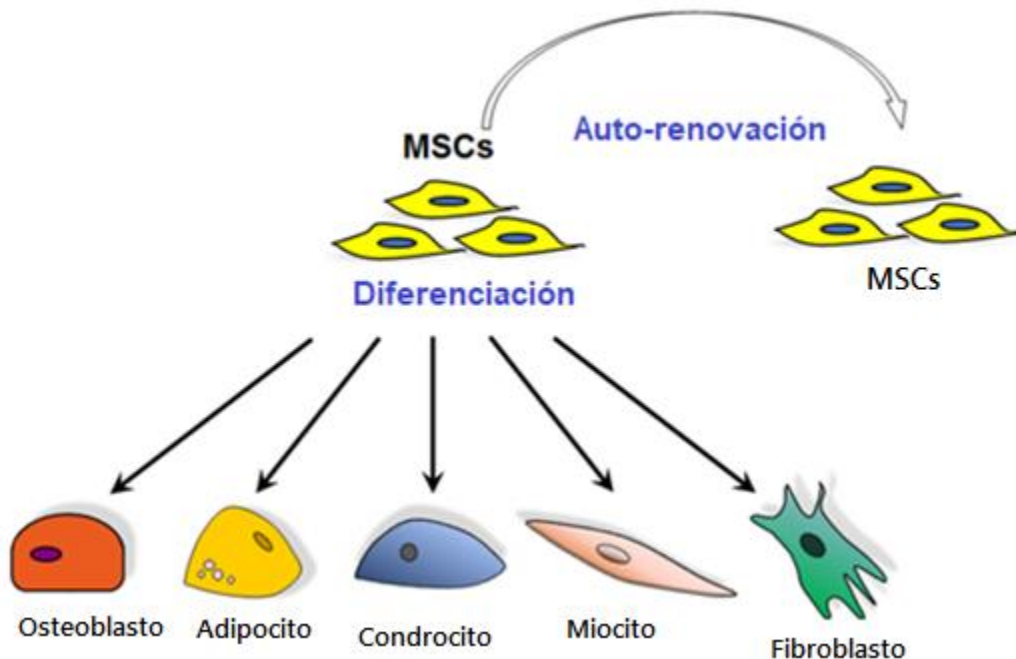


Figura 6: Esquema de la diferenciación de células troncales mesenquimales (Hu, 2018).

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCR) para que las MSCs puedan ser utilizadas con fines médicos deben cumplir con los siguientes criterios (Gimble, 2007).

1. Presencia en cantidades muy abundantes (millones a billones de células).
2. Aislables con procedimientos mínimamente invasivos.
3. Diferenciables en múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible.
4. Trasplantables en forma autóloga.
5. Manipulables.

La transformación de MSCat a la estirpe ósea es un proceso altamente programado que consta varias etapas: la proliferación, la diferenciación, la deposición de matriz, la mineralización y la maduración de la matriz. El protocolo general para la diferenciación hacia el linaje osteogénico *in vitro* implica el cultivo en monocapa de MSCat en un medio que contiene dexametasona, β -glicerol-fosfato y ácido ascórbico durante un periodo de dos a cuatro semanas. La dexametasona es un glucocorticoide sintético que estimula la proliferación de las MSCs y es esencial para la diferenciación osteogénica, la concentración óptima de este reactivo para la diferenciación ósea en MSCs que se ha reportado es de aproximadamente 10nM, lo que corresponde a concentraciones fisiológicas adecuadas (Walsh, 2001). El fosfato orgánico liberado después de hidrólisis enzimática del beta glicerol-fosfato juega un papel importante en la mineralización de la matriz. Este fosfato libre se aplica generalmente en concentraciones de 5-10 mM para la diferenciación ósea de MSCs. El ácido ascórbico es un cofactor en la hidroxilación y lisinación de las moléculas de colágeno, se atribuye principalmente a la secreción de Colágeno tipo 1 en la matriz extracelular (Yamachika, 2013).

Las MSCat cultivadas en presencia de estos factores expresan genes y proteínas asociadas con el fenotipo de los osteoblastos, que incluyen fosfatasa alcalina (ALP), colágeno tipo I (Col 1), Osteopontina (Op), Osteonectina (On), Osteocalcina (Oc), Runx2, Osterix (Osx), Proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2), BMP-4 y

receptores BMP I y II. Además, cuando se cultivan entre 14 y 28 días *in vitro* en medio osteogénico, las MSCat comienzan a producir mineral de fosfato de calcio dentro de su matriz extracelular, que puede detectarse mediante tinción con rojo de alizarina o von Kossa. Es importante destacar que las MSCat sometidas a inducción osteogénica son capaces de adherirse a andamios, migrar, proliferar y diferenciar cuando se trasplantan a tejido óseo *in vivo* (Hu, 2018).

4 JUSTIFICACIÓN

La regeneración de defectos óseos es un reto clínico, ya que la pérdida ósea se produce por diferentes circunstancias como: traumatismos, enfermedad periodontal, pérdida dental, envejecimiento, neoplasias, alteraciones hormonales e infecciones, principalmente. Debido a los riesgos involucrados en el uso de tratamientos convencionales, la ITO intenta buscar nuevas estrategias basadas en mecanismos endógenos de regeneración ósea con el implemento de constructos regeneradores de hueso.

El injerto de hueso autólogo es considerado el estándar de oro, sin embargo, el procedimiento da lugar a molestias y morbilidad del sitio donante, resultando ser difícil de regenerar en la forma deseada, tanto en el sitio donante como en la zona que lo recibe, además de requerir de dos procedimientos quirúrgicos por lo que es un problema, particularmente importante en la región cráneo-facial. Un sustituto de injerto óseo debe ser osteoconductor, osteoinductor, biocompatible, biodegradable, estructuralmente similar al hueso, fácil de usar y rentable económicamente.

La IT propone la creación de constructos como una opción para restaurar, mantener o mejorar la función de un órgano o tejido, a partir de la manipulación de las matrices tridimensionales, las células y los factores de crecimiento y diferenciación.

El PLA es un biomaterial biocompatible, poroso y biodegradable, por lo que puede ser considerado como un buen andamio y las MSCat representan una fuente celular con alta capacidad de proliferación, auto-renovación y diferenciación, que además cuentan con las señales para inducir la regeneración ósea.

Ambos, el andamio de PLA y las MSCat diferenciadas al linaje osteogénico, en un constructo que puede ser una estrategia útil para la regeneración ósea y por ello, deben ser evaluados para determinar su seguridad de uso, su potencial osteogénico y eficacia en la regeneración.

5 ANTECEDENTES

El incremento de pérdidas óseas debido a diferentes patologías, ha requerido de encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de la regeneración ósea, con el objetivo de disminuir tiempos en el tratamiento y costos. En los últimos años, numerosos estudios han reportado diferentes alternativas para este propósito, en el que se busca conducir e inducir la regeneración, para ello, se han empleado diferentes sustitutos, como lo son: injertos, biomateriales, terapia celular, entre otros. Los continuos estudios en la ITO han llevado a grandes avances en el área de regeneración ósea.

Entre los distintos biomateriales, el PLA ha demostrado ser biocompatible. En su estudio Wang Xi y cols. en 2017 (Wang, 2017), evaluaron su biocompatibilidad, así como la proliferación y morfología celular en células aisladas de la pulpa de dientes humanos de la primera dentición (SHED) en contacto con extracto de PLA 100%. Las células cultivadas en extracto PLA durante 7 días no fueron significativamente diferentes morfológicamente en comparación con las células que fueron sembradas solo con D/MEM/ FBS al 5%, solo algunas células sembradas en el PLA se observaron de menor tamaño; y mediante pruebas de MTT observaron que no hay diferencias en la proliferación. En su evaluación para la diferenciación osteogénica después de 14 días, observaron que las SHED con medio osteogénico y extracto de PLA tenían nódulos mineralizados grandes, concentrados y de color claro; y expresaron RUNX2 y Osx. Concluyeron que la aplicación del biomaterial PLA en la Ingeniería de Tejidos es factible debido a su buena histocompatibilidad y su capacidad de mejorar la tasa de mineralización de SHED.

Lee Hye-Young y cols. en el 2012 (Lee, 2012), evaluaron la biocompatibilidad en andamios 3D porosos de PLA hechos con líquidos iónicos a temperatura ambiente como un nuevo porógeno (RTIL) al que le sembraron BMSCs durante un periodo de 4 semanas que reveló una buena compatibilidad tisular del andamio, con el crecimiento interno de las células y la formación de tejido con colágeno alrededor y profundo en los poros del andamio y sin una reacción inflamatoria significativa.

Los resultados del MTT mostraron una buena viabilidad celular sobre el andamio 3D. Después de 7 días en cultivo las células eran casi confluentes y comenzaban a penetrar en los poros del andamio, por lo que confirmaron que el andamio tenía respuestas celulares favorables *in vitro*, apoyando la proliferación de células mesenquimales con el tiempo de cultivo y estimulando su diferenciación osteogénica.

En referencia al empleo de MSCat, Ji Wenchen y cols. en el 2013 (Ji, 2013), extrajeron, identificaron y diferenciaron MSCat de ratas Sprague-Dawley y evaluaron su biocompatibilidad con un andamio hecho de fibrina de seda-quitosano (SFCS). Evaluaron la adhesión, proliferación por medio de ensayo de MTT y morfología celular por medio de MEB. En sus resultados de la inducción osteogénica observaron diferenciación al linaje osteogénico en las células después de 2 semanas y a las 4 semanas observaron la formación de nódulos de calcio. En general, sus resultados indicaron que las MSCat tienen una buena biocompatibilidad con los andamios SFCS y, por lo tanto, proporcionan una base para estudios adicionales utilizando métodos de Ingeniería de Tejidos.

Liang, H y cols. en 2014 (Liang, 2014), sembraron células de tejido adiposo (ADS) de rata en andamios de PLGA y microsferas porosas, en tres grupos: 1) grupo D/MEM, 2) con medio de diferenciación osteogénica (ODM) que se cultivó con D/MEM de inducción osteogénica con 0.01 M 1 de 25-dihidroxitamina D3, 50mM de ascorbato-2-fosfato, y 10mM β -glicerofosfato y 3) grupo ODM + GDF5 (diferenciación factor de 5) que se cultivó con ODM suplementado con 100ng/ml de GDF5 recombinante humana, esto por un tiempo de 2 semanas. El estudio *in vivo*, cultivaron ADS en los andamios de PLGA, realizaron dos defectos en las partes anteriores de los cuerpos vertebrales (VBs) de 2mm de profundidad x 4mm de ancho x 4mm longitud e implantaron los PLGA y suturaron a un tiempo de 2 a 8 semanas. Evaluaron la distribución de las células mediante MEB y la formación de hueso en cada VB usando tomografía computarizada cuantitativa (CT).

Como resultados, *in vitro* las células ADS cultivadas con ODM y ODM+GDF5 fueron positivas para Von Kossa. Esta mineralización fue cualitativamente mayor en el grupos ODM+GDF5 que en el grupo de ODM; no observaron mineralización en las células ADS cultivadas solo en el D/MEM. La formación de imágenes de MEB reveló que las células en el andamio PLGA se extendieron cubriendo la superficie de las microesferas en 24 horas. *In vivo*, la CT reveló que los implantes con células GDF5 inducidas demostraron más formación de hueso que los grupos de control. Además, tanto los grupos ODM como ODMpGDF5 demostraron un aumento significativo de masa ósea entre 6 y 8 semanas no se ve en el grupo D/MEM. Concluyeron que las ADS mantuvieron su capacidad de diferenciarse en los andamios de microesferas sintetizados con PLGA cuando son inducidos por osteogénicos en medio *in vitro*, también demuestra que las células mesenquimales se mantienen en la estructura de un andamio y tratado con un factor de crecimiento podría ser utilizado para mejorar la reparación tisular *in vivo*.

6 HIPÓTESIS

Los constructos hechos con andamios de PLA sembrados con células MSCat en un medio de cultivo osteogénico *in vitro*, sí serán citocompatibles e inducirán la diferenciación osteogénica.

7 OBJETIVOS

General:

- Evaluar la citocompatibilidad de un constructo de Ingeniería de Tejidos Óseos, elaborado con un andamio de PLA y MSCat diferenciadas al linaje osteogénico.

Específicos:

- Evaluar la degradabilidad *in vitro* e *in vivo* del andamio de PLA.
- Evaluar la biocompatibilidad *in vivo* del andamio de PLA.
- Observar la organización celular dentro del constructo.
- Evaluar la capacidad de adherencia, sobrevivencia y migración de las poblaciones celulares de MSCat y FB en los andamios de PLA.
- Evaluar y comparar la capacidad de diferenciación de poblaciones celulares MSCat y Fb cuando son expuestas a medio osteogénico (M.O.) y M.O. adicionado con Aspirina (ASA).
- Evaluar osteoconducción de los constructos tisulares realizados.

8 METODOLOGÍA

Todos los estudios realizados en la presente tesis se realizaron en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4 (FES-C4) y el Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I) dentro del Grupo de Investigación en Células Troncales e Ingeniería de Tejidos (GICTIT) ubicados en la calle Jesús Jiménez Gallardo, Industrial Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, México. Este estudio cuenta con el aval del comité de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM con el número 1211; el cuidado y uso de animales del laboratorio se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana “NOM-062-ZOO-1999”; los desecho orgánicos se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana “NOM-087-ECOL-SSA1-2002”; el manejo de residuos se realizó de acuerdo a la “Guía técnica” de la Comisión de Bioseguridad de la FESI con el número de aval 071, que se encuentra dentro del proyecto principal de “Regeneración de hueso mandibular *In vivo* por medio del uso de Ingeniería de Tejidos”, que se encuentra avalado por el Comité de Ética con el folio 1074 y el Comité de Bioseguridad con folio 036.

8.1 Andamio de PLA.

El andamio de PLA 10% (membrana preparada con 10 gr de PLA, 75ml de cloroformo y 25 ml de etanol mediante la técnica de electrohilado), de forma laminar con un grosor de 0.7 a 1mm. Donadas por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, UNAM.

8.1.1 Acondicionamiento del PLA antes de su uso.

El PLA fue cortado de distintos tamaños, según requería el estudio, con medidas de 1x1cm, 4x2mm y 1cm de diámetro, se esterilizaron con rayos UV durante 30 minutos (figura 7) y se colocaron en placas de 24 pocillos con D/MEM suplementado y se incubaron a 37°C/5%CO₂ por 5 días para que el biomaterial absorbiera el medio necesario, para que las células posteriormente, pudieran penetrar en los andamios. Pasado ese tiempo, se retiró el medio que tenía el biomaterial y se procedió al sembrado de células.



Figura 7: Imagen de esterilización del PLA en la cámara de UV.

8.1.2 Degradación *in vitro* del PLA.

La degradación del PLA se evaluó colocando andamios de 1cm de diámetro en una placa de 24 pocillos, los cuales se pesaron en seco y en el medio de cultivo correspondiente. Para las pruebas se colocaron los PLA en los siguientes grupos (n=6): PBS 1x, D/MEM suplementado; Colagenasa I al 0.01% y Tripsina 0.25% y los tiempos de estudio fueron: 3 horas, 1 día, 3 días, 7 días, 10 días, y 14 días, en cada tiempo fueron pesados retirándolos del medio de cultivo y retirando exceso de líquido con papel filtro y posteriormente fotografiados (figura 8).

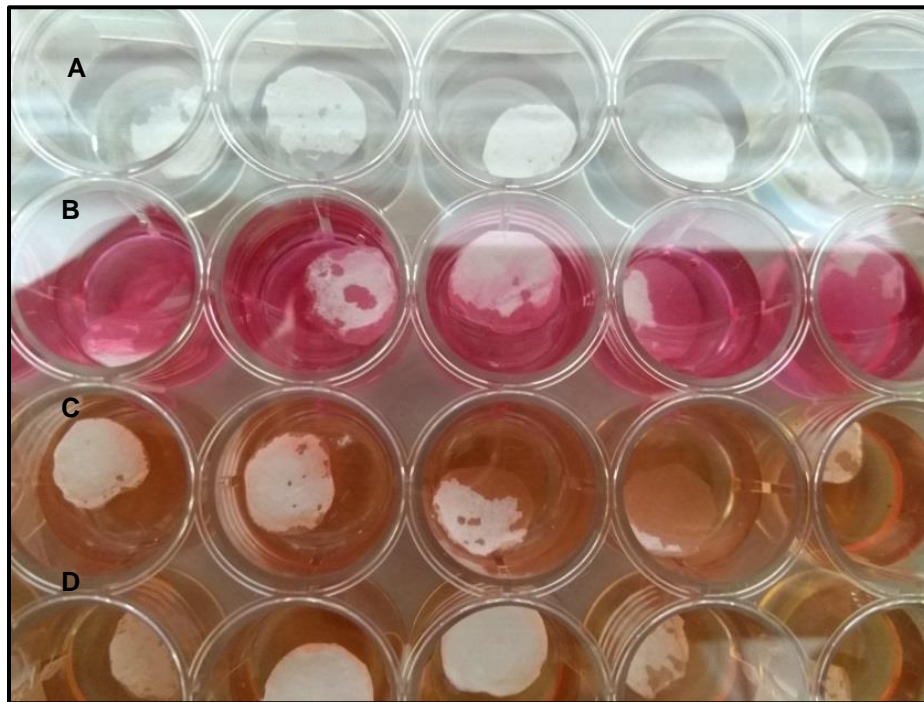


Figura 8: Imagen de placa de multipocillos con los andamios PLA a las 24 horas en: A) PBS 1x; B) D/MEM suplementado; C) Colagenasa; D) Tripsina 0.25%.

8.2 Diseño experimental de estudios *in vitro*.

Para la extracción de biopsias para el aislamiento primario de los cultivos celulares, se emplearon un total de 8 ratas Wistar macho con peso: 250+/-50g divididos aleatoriamente en los siguientes grupos de estudio (n=4).

Grupo experimental	Grupo control	Tiempo
Cultivos de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo indiferenciadas (MSCat).	Cultivos de fibroblastos (Fb)	14 días
Cultivos de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo inducidas a la diferenciación osteogénica (MSCost).	Cultivos de fibroblastos inducidos a la diferenciación osteogénica (Fbost).	14 días
PLA + MSCat.	PLA + Fb.	14 días
PLA + MSCost.	PLA + Fbost.	14 días

8.3 Extracción de biopsias de piel para el aislamiento de fibroblastos.

Para la extracción de piel, los animales fueron pesados en báscula digital y anestesiados vía intraperitoneal con Sedalphorte® (Pentobarbital sódico 43mg/kg de peso) y un relajante muscular de PROCIN® (Xilazina, 7mg/kg de peso). El área quirúrgica fue rasurada y desinfectada con solución Antibenzil® (cloruro de benzalconio) y con un bisturí #15 se realizó una incisión en una sola intención de 2cm² de longitud en la zona dorsal (figura 9). Se utilizaron pinzas mosco para realizar la disección roma, se separó la piel del tejido adiposo subcutáneo y se tomó una biopsia de un área aproximada de 2 cm²; posteriormente, el tejido obtenido se colocó en un tubo con solución HBSS1x Biowest® con antibiótico/antimicótico al 2% Biowest® para su transporte y su inmediato procesamiento. Los especímenes fueron sacrificados en una cámara de CO₂.



Figura 9: Imagen del procedimiento quirúrgico de extracción de piel.

8.3.1 Obtención de células de fibroblastos (Fb) y su expansión.

En el cuarto de cultivos de GICTIT dentro del Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz, se realizó la extracción de los Fb en condiciones estériles en una campana de seguridad biológica clase II, tipo 2.

Se realizaron 3 lavados del tejido con HBSS 1x Biowest® adicionado con 1% de antibiótico/antimicótico Biowest®, para eliminar restos de sangre, pelo y cualquier agente contaminante, se retiró la epidermis y la hipodermis, la dermis se disgregó en fragmentos (explantos) de 2mm de diámetro, se colocaron los explantos en frascos de 25cm² y se llevó a la incubadora a 37°C/5%CO₂ durante 3 horas para que los explantos se adhirieran al plástico y después, se completó con F-12 suplementado [FBS (Fetal Bovine Serum)] 10% Biowest® y antibiótico/antimicótico 2% Biowest®) (figura 10). Después de 5 días se retiraron los explantos y el cultivo se lavó con HBSS 1x. Los cultivos fueron mantenidos realizando cambios de medio cada 48 horas, hasta alcanzar confluencia de 80%, para después estimar la viabilidad celular mediante el método con Solución Azul Tripano 0.4% Sigma Aldrich® catalogo:T8154.

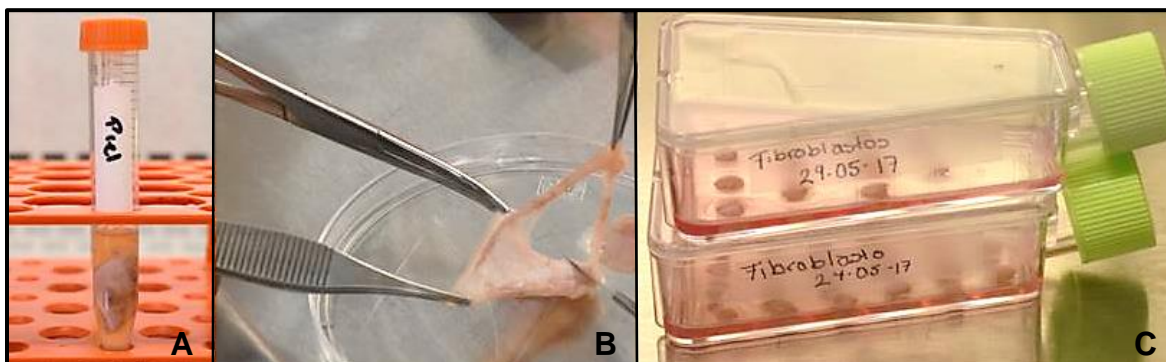


Figura 10: Imágenes del procedimiento *in vitro* para el aislamiento de Fb a partir de explantos de dermis: A) biopsia de piel en lavado con HBSS 1X; B) separación de la epidermis y la hipodermis para la obtención de la dermis y obtención de los explantos; C) explantos sembrados en frascos de cultivo.

8.4 Extracción del tejido adiposo.

Para la extracción de tejido adiposo subcutáneo, los animales fueron pesados en una báscula digital y anestesiados vía intraperitoneal con Sedalphorte® (Pentobarbital sódico, 43mg/kg de peso) y un relajante muscular de PROCIN® (Xilazina, 7mg/kg de peso). El área quirúrgica fue rasurada y desinfectada con solución Antibenzil® y se realizó una incisión en una sola intención de 2cm de longitud en la zona del dorso lateral posterior con un bisturí del #15. Se utilizaron pinzas mosco para realizar la disección roma, se separó el tejido adiposo subcutáneo de la piel y se tomaron biopsias del tejido adiposo con un peso de aproximadamente 3g (figura 11); posteriormente, el tejido obtenido se colocó en un tubo con solución HBSS 1x Biowest® adicionado con antibiótico/antimicótico al 2% Biowest® para su transporte e inmediato procesamiento.

Se suturó la herida con seda 3-0 estéril utilizando la técnica de puntos simples. Para evitar infecciones los especímenes fueron medicados con antibiótico ENROXIL 5% (Enrofloxacin, 5mg/ kg de peso) después de la cirugía y cada 24 horas durante 3 días. Para minimizar las molestias postquirúrgicas y de acuerdo al reglamento interno para el cuidado y uso de los animales de experimentación en investigación y docencia en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, las ratas fueron tratadas con analgésico TRAMADOL JET® (Tramadol 5mg/kg de peso) cada 24 horas durante 3 días.



Figura 11: Imagen del procedimiento quirúrgico de la obtención de las biopsias de tejido adiposo subcutáneo.

8.4.1 Obtención de Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo (MSCat) y su expansión.

En el cuarto de cultivos de GICTIT dentro del Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz, se realizó la extracción de las MSCat en condiciones estériles en condiciones estériles en una campana de seguridad biológica clase II, tipo 2.

Se realizaron 3 lavados del tejido con HBSS 1x Biowest® adicionado con 1% de antibiótico/antimicótico Biowest®, para eliminar restos de sangre, pelo y cualquier agente contaminante, se disgregó el tejido en fragmentos de 1 a 2mm de diámetro con bisturí #11, esto con la finalidad de facilitar la digestión enzimática, que fue realizada con 3ml de Colagenasa tipo I al 0.01% Gibco® a 37°C y en agitación manual cada 5 minutos, durante 40 minutos, pasado ese tiempo la reacción enzimática se inactiva con 900µl de FBS Biowest®, se filtró con una malla de nylon de 100µm de poro dentro de un tubo tipo Falcon de 50ml para separar la matriz que no fue digerida y la solución obtenida se centrifugó a 1200rpm durante 10 minutos. Al momento de centrifugar se obtuvieron 3 capas: una capa aceitosa o grasa del tejido adiposo, una capa acuosa y el botón celular. Se retiró la capa aceitosa con una pipeta, y se volvió a centrifugar dos veces más y entre cada centrifugación se retiró el sobrenadante por decantación de forma que el botón celular quedara lo más limpio posible.

El botón celular obtenido de la última centrifugación fue re-suspendido en D/MEM suplementado Biowest® y se sembró en frascos de cultivo de 25cm² (figura 12), y se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo con D/MEM suplementado, incubadas a 37°C/5%CO₂. Después de 48 horas, se observó el cultivo al microscopio invertido, las células no adherentes fueron removidas y se lavó con HBSS 1x Biowest® y fueron mantenidas realizando cambios de medio cada 48 horas, hasta alcanzar confluencia de 80%.

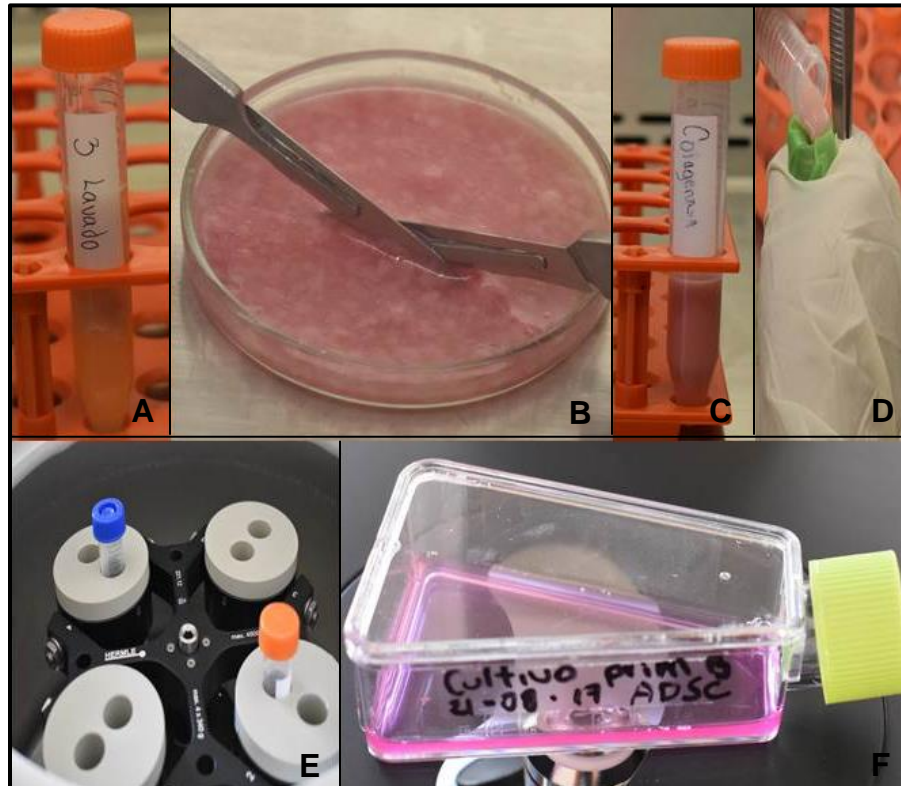


Figura 12: Imágenes del procedimiento in vitro para el aislamiento de células MSCat del tejido adiposo subcutáneo: A) lavado del tejido con HBSS 1X; B) disgregación mecánica bisturí del #11; C) digestión enzimática con Colagenasa 1; D) filtrado en malla de nylon de 100 μ m de poro; E) centrifugación; F) cultivo primario.

8.5 Subcultivos.

Al cultivo celular en confluencia se realizó un lavado con solución HBSS 1x, se agregó 1ml de Tripsina (0.25% Trypsin /EDTA 0.1% in HBSS) Biowest® durante 3 a 5 minutos en la incubadora a 37°C/5%CO₂, después se verificó en el microscopio invertido que la células se encontraran en completa suspensión para inactivar la reacción enzimática con 300µl de FBS, la suspensión se centrifugo a 1200rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se re-suspendió con 1mililitro de D/MEM para su cuantificación y posterior sembrado.

8.6 Cuantificación con cámara de Neubauer.

Se tomaron 50µl de la suspensión celular homogenizada (bajo la fórmula de dilución), se colocó en un tubo tipo eppendorf de 0.5ml, al cual se adiciono la misma cantidad de azul Tripano para contrastar las células viables, se homogenizo y se tomaron 10µl de la solución, se montó en la cámara de Neubauer por capilaridad para que el líquido se disipara de forma uniforme y se realizó el conteo de los cuatro cuadrantes (figura 13).

C1* V1 = C2* V2: Es la fórmula para las diluciones donde **C1** es la concentración de la solución que hará un soluto **V1** el volumen inicial **V2** el volumen a preparar y **C2** la concentración de la solución final.

Factor de dilución se calculó:

$$\frac{C1}{C2} = \frac{V2}{V1}$$

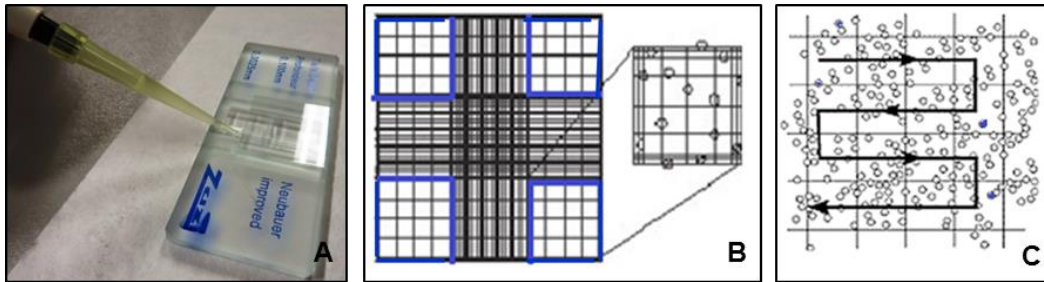


Figura 13: Imagen del conteo celular en cámara de Neubauer: A) montaje celular por capilaridad; B) es el grabado de la cámara (hematocitómetro) en la que se cuentan los cuadrantes en azul por el tamaño celular; C) esquema del recuadro de recuento en donde solo contamos las células blancas o brillantes y se marcan como células no viables las células teñidas de azul.

8.7 Técnica de sembrado.

Una vez determinado el número de células en 1ml, se realizó el cálculo siguiente teniendo en cuenta que se requería sembrar 1×10^4 células por ensayo:

$$\text{Número de células a sembrar} = \frac{10,000 \text{ células} \times 1000 \mu\text{l}}{\text{total de células.}}$$

Obteniendo como resultado la cantidad de microlitros que contiene el valor estimado de células.

El sembrado se realizó en placas de 24 pocillos que contenían dentro cubreobjetos de 12mm de diámetro y los andamio de PLA de 1x1cm, las células se concentraron en el centro de los cubreobjetos y el PLA, se llevaron a incubar por 3 horas para dejar que se adhirieran a la superficie (figura 14), y posteriormente, completar con medio de cultivo según el grupo correspondiente con: D/MEM suplementado, medio osteogénico o medio osteogénico con aspirina. El medio de cultivo se cambió cada tercer día y se mantuvieron así durante 14 días.

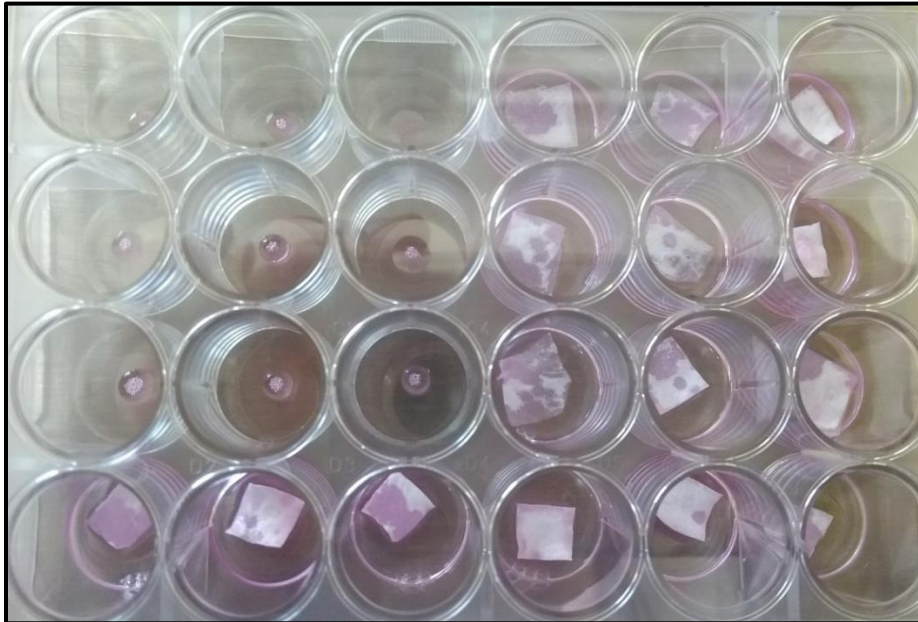


Figura 14: Imagen del sembrado celular sobre los cubreobjetos y los andamios de PLA.

8.8 Diferenciación al linaje osteogénico.

Posterior al sembrado sobre los cubreobjetos con los andamios de PLA, para inducir a las MSCat a la diferenciación osteogénica, éstas fueron cultivadas en dos diferentes medios osteogénico: el primero contenía D/MEM suplementado con FBS 10%, antibiótico/antimicótico al 2%, dexametasona 0.1mM, beta-glicerol-fosfato 10mM, ascórbato-2-fosfato 10mM, y el segundo, al que además de todo lo anteriormente mencionado, también se le adiciono ASA al 1mM (Abd Rahman, 2016). Se les realizó el cambio de medio cada 3 días durante 14 días.

8.9 Fijación celular.

La fijación de los cubreobjetos con los andamios de PLA se realizó retirando el medio de cultivo, y se lavó con solución de HBSS 1x. Los andamios se fijaron con paraformaldehído al 3% pH 7.4 durante 5 minutos y se retiró. Se realizaron tres lavados con PBS 1x estéril durante 5 minutos cada uno y finalmente, se dejaron los andamios con PBS 1x y las placas se sellaron con parafilm y almacenaron a 4°C para su uso posterior (figura 15).



Figura 15: Imagen de fijación de muestras con paraformaldehído al 3% y lavados posteriores con PBS 1x.

8.10 Inmunofluorescencia.

Grupo de estudio	Grupo control
MSCat+ D/MEM	Fb+ D/MEM
MSCat+ MO	Fb+ MO
MSCat+ ASA	Fb+ MO+ ASA
PLA+ MSCat+ D/MEM	PLA+ Fb+ D/MEM
PLA+ MSCat+ MO	PLA+ Fb+ MO
PLA+ MSCat+ ASA	PLA+ MO+ ASA

Control Positivo

Cortes de mandíbula.

Control Negativo

Cortes de mandíbula solo con anticuerpo secundario.

Anticuerpo	Especificidad	Disolución	Proveedor
OsteocalcinFL-100 (Rabbit polyclonal IgG) (primario)	Osteoblastos maduros (marcaje celular y de matriz).	1:250	Santa Cruz Biotechnology.
Goat anti-rabbit IgG-FITC (anti-rabiit) (secundario)	Molécula fluorescente verde.	1:200	Santa Cruz Biotechnology.
DAPI	Núcleos.	1:1000	

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en la técnica de Inmunofluorescencia.

Una vez fijadas las muestras, se realizaron tres lavados con PBS 1x con una duración de 5 minutos por lavado, se adicono un tampón de bloqueo y permeabilidad, para descartar zonas de unión inespecíficas, se usó PBS 1x complementado con 1% de FBS, 3% de BSA y 0.1% de Tritón, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se delimitó con lápiz hidrófobo los portaobjetos de controles positivos y negativos, se colocó el anticuerpo primario (ver tabla 3) a una

dilución de 1:250 y se incubó a 37°C durante una hora. Posterior a la incubación, se realizaron 3 lavados de PBS 1x y se colocó el anticuerpo secundario (ver tabla 3) unido a una molécula fluorescente a una dilución 1:200 a partir de este paso las muestras se protegieron de la luz, se incubó durante 45 minutos, se realizaron 3 lavados con PBS 1x, se colocó el marcador DAPI a una dilución de 1:1000 y se incubó por 10 minutos, se realizaron 3 lavados con PBS 1x y se realizó el montaje con polyvinylpyrrolidone Sigma-Aldrich® num. Cat.:PVP10.

Las muestras se mantuvieron en oscuridad a 4°C (figura 16), hasta su observación en el microscopio de fluorescencia AXIO LAB de Zeiss® de la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED) de la FESI.



Figura 16: Imágenes de proceso de Inmunofluorescencia de multipocillos (experimental) y portaobjetos (control positivo y negativo).

8.11 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Grupos de estudio

PLA+ MSCat+ D/MEM

PLA+ MSCat+ MO

14 días

Para analizar la adhesión y proliferación celular sobre el PLA se tomaron imágenes por medio de microscopia electrónica de barrido (MEB); para ello, los andamios de PLA estériles de forma rectangular de 4x2mm fueron colocados en placas de 96 pocillos y con D/MEM suplementado y se incubo a 37°C/5%CO₂ por 5 días para que el biomaterial absorbiera el medio para que las células penetraran, pasado ese tiempo se retiró el medio y se sembraron 1x10⁴ de MSCat del tercer subcultivo y se dejaron que las células se adhirieran al andamio durante 3 horas y posteriormente, se completó con D/MEM suplementado y con medio osteogénico por un tiempo de 14 días, realizando cambios de medio cada 3 días. Posteriormente, los constructos se fijaron con paraformaldehído al 3%, se lavaron con PBS 1x, se deshidrataron OH del 70% por 24 horas, OH 96% por 24 horas y OH absoluto por 48 horas y metalizaron con una película de oro (figura 17) para su observación en el MEB JEM-1400 del Laboratorio de Nacional de FESI, ubicado en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) con el apoyo de la responsable del microscopio electrónico de transmisión y barrido, la Dra. María Rosa Ávila Costa que nos apoyó para la toma de fotografías.

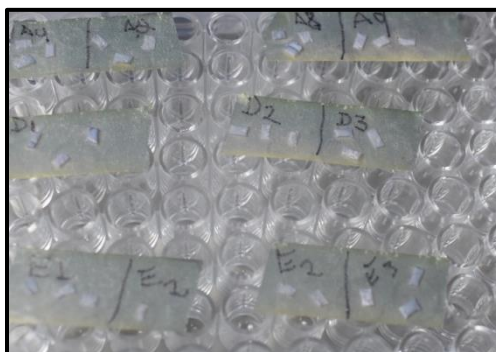


Figura 17: Imagen de constructos de PLA metalizados.

8.12 Degradación *in vivo* del PLA.

Para el estudio de la degradación del PLA y su grado de biocompatibilidad. Los animales fueron pesados en báscula digital y anestesiados vía intraperitoneal, con Sedalphorte® (Pentobarbital sódico 43mg/kg de peso) y el relajante muscular de PROCIN® (Xilazina, 7mg/kg de peso). El área quirúrgica (dorso de las ratas) fue rasurada y desinfectada con solución Antibenzil® y se realizó una incisión en una sola intención de 1cm de longitud con un bisturí del #15. Después de realizar la incisión en forma de “sobre”, se colocó el andamio de PLA de 1cm de diámetro y se suturo la herida con seda 3-0 estéril utilizando la técnica de puntos simples (figura 18). Para evitar infecciones los especímenes fueron medicados con antibiótico ENROXIL 5% (Enrofloxacin, 5mg/ kg de peso) cada 24 horas durante 3 días y con analgésico TRAMADOL JET (Tramadol 5mg/kg de peso) durante el mismo periodo. Después de los tiempos de estudio de 7 y 14 días, los especímenes fueron nuevamente anestesiados y se obtuvo toda la muestra de la piel dorsal del área en donde se colocó el andamio con un margen de 3mm. Posteriormente, los especímenes fueron sacrificados en cámara de CO₂. Las muestras se lavaron con PBS y fueron fijadas (paraformaldehído 4% pH 7.4 durante 24 horas), una vez fijadas se lavaron con agua destilada y posteriormente se deshidrataron en OH en concentraciones crecientes de 50%, 70%, 90% y 100%. Posterior a esto se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 micras y teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E).

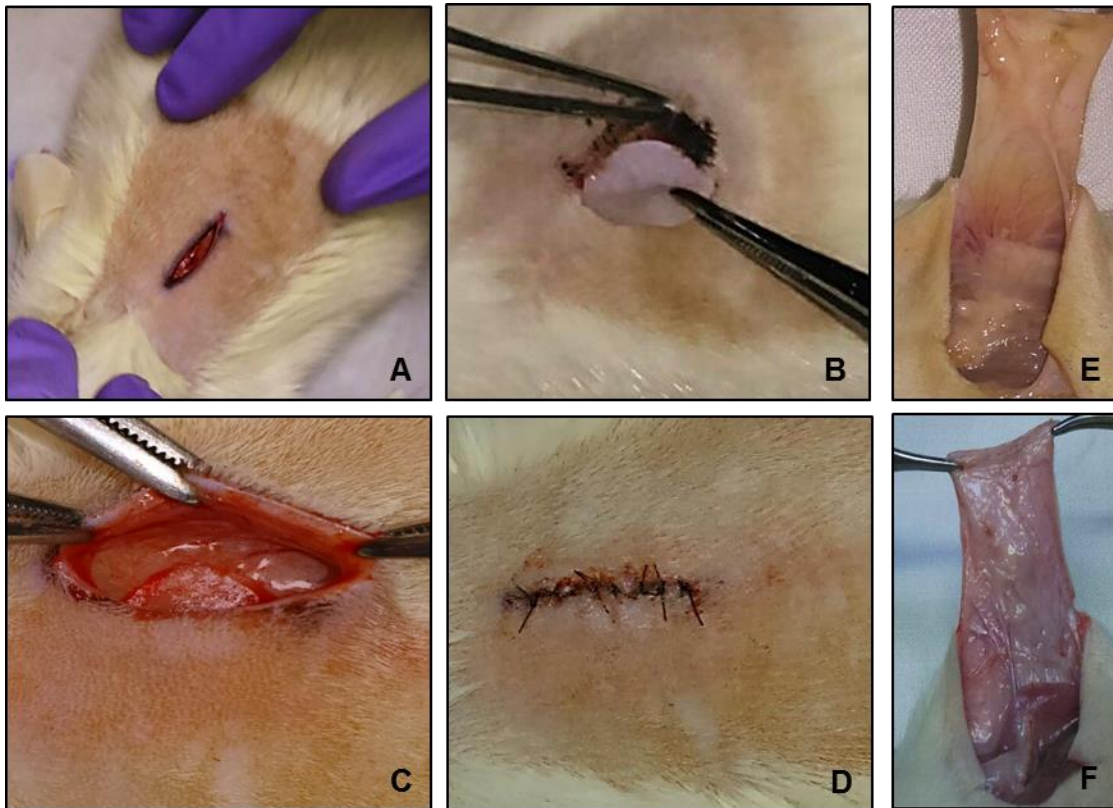


Figura 18: Procedimiento quirúrgico para la implantación de los andamios de PLA *in vivo*: A) medición e incisión; B) apertura en sobre con disección roma; C) implante del andamio de PLA; D) sutura de la herida; E) y F) biopsia de la piel después del tiempo de estudio.

9 RESULTADOS

9.1 Degradación *in vitro* de PLA.

Los andamios de PLA fueron sometidos a pruebas de degradación por medio de enzimas, fueron fotografiados (figura 19) y pesados, se observó en los 6 primeros días aumento de peso de los andamios y conforme pasaban los días fue disminuyendo el peso (gráfica 1). En los PLA sometidos a degradación se pudo apreciar en las fotografías la pérdida de fibras, por lo que se observaron zonas no homogéneas en el andamio. Esta pérdida de fibras fue más evidente en el grupo Tripsina. También se realizaron observaciones en el microscopio invertido Axio Vert.A1 ZEISS® durante el estudio (figura 20).

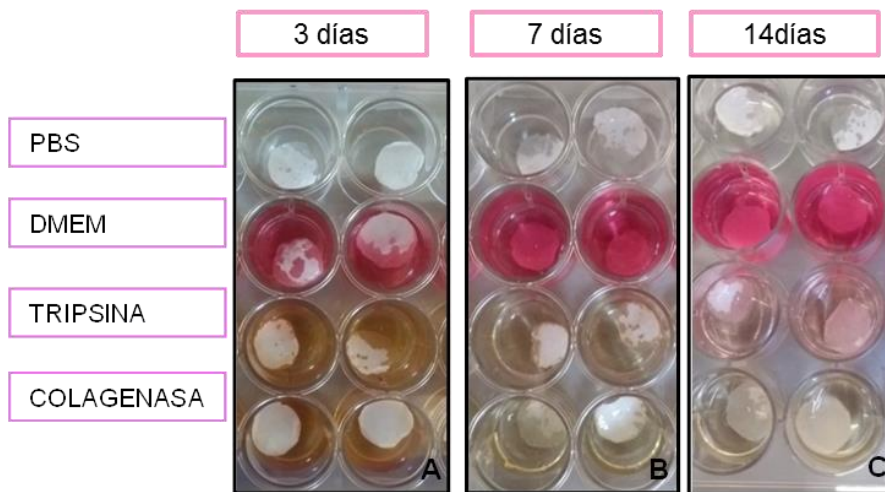
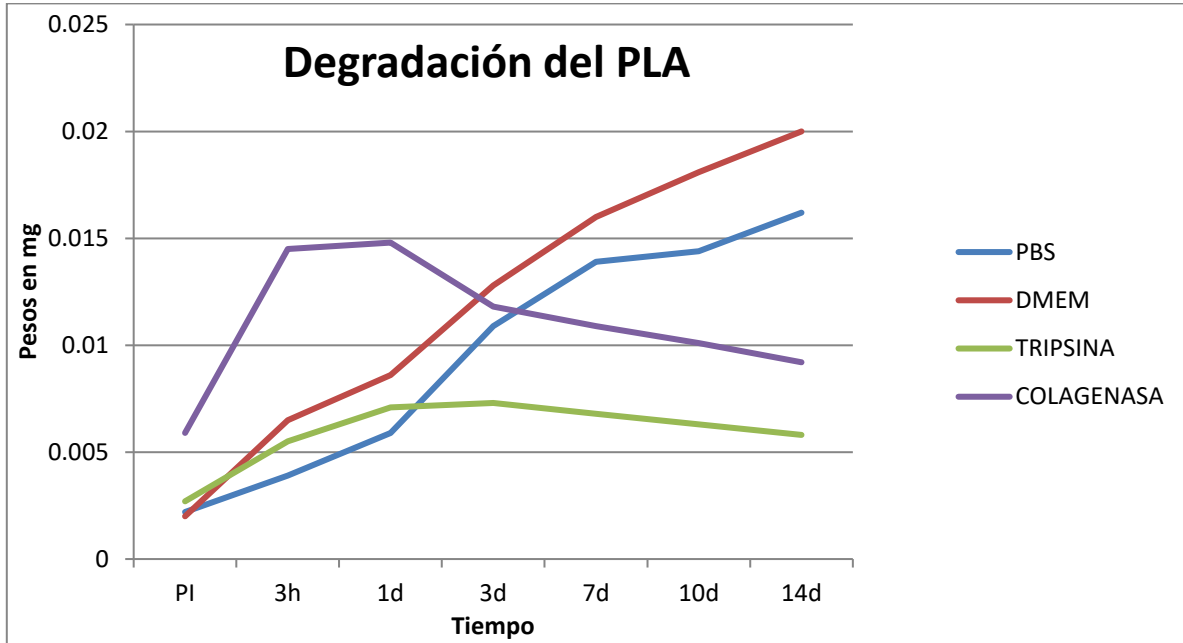


Figura 19: Fotografías macroscópicas de los andamios de PLA durante el estudio de degradación.



Grafica 1: Degradación del PLA con enzimas. En donde pesamos en los biomateriales en mg (eje de las y), En el eje de las X se muestra el peso inicial y los pesos a lo largo de 14 días, en azul el control con PBS, en rojo con DMEM, en verde con Tripsina 0.25%. y en morado con colagenasa 1 al 0.01%.

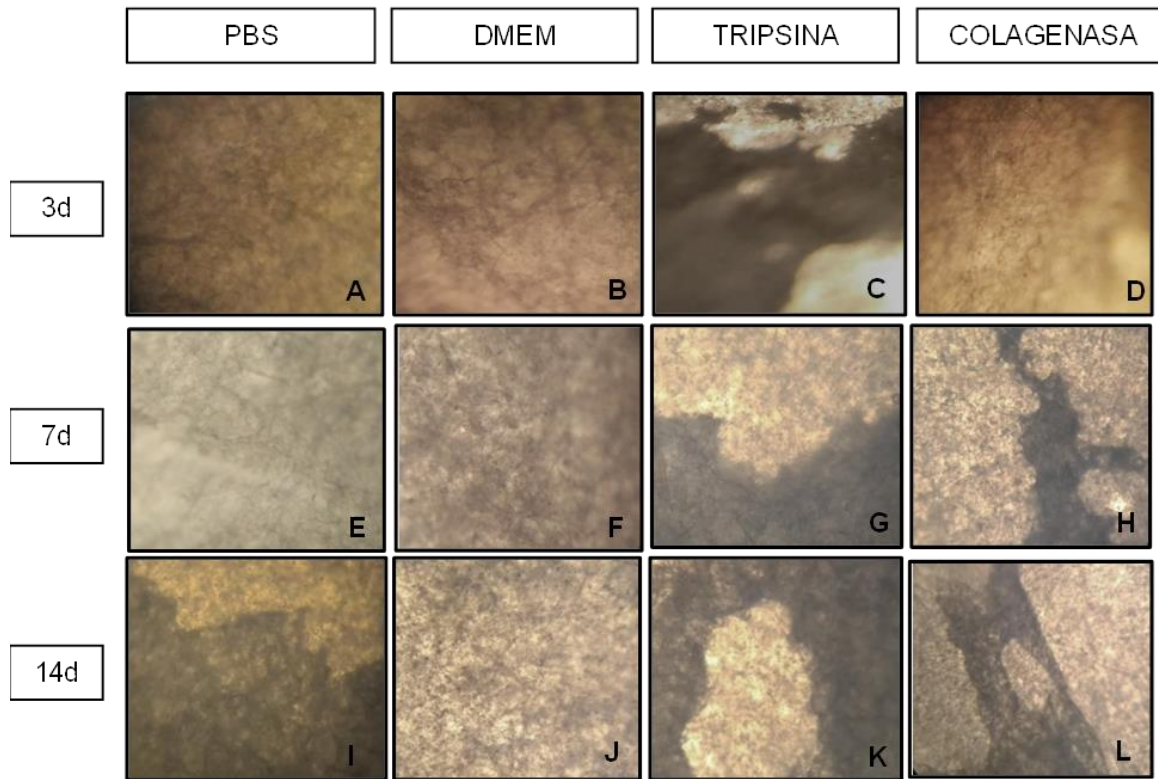


Figura 20: Fotografías tomadas en el microscopio invertido a aumento de 10X de los andamios de PLA: A) 3 días en PBS; B) 3 días en D/MEM; C) 3 días en Tripsina; D) 3 días en Colagenasa; E) 7 días en PBS; F) 7 días en D/MEM; G) 7 días en Tripsina; H) 7 días en Colagenasa; I) 14 días en PBS; J) 14 días en D/MEM; K) 14 días en Tripsina; L) 14 días en Colagenasa.

9.2 Aislamiento de cultivo de MSCat.

La extracción de tejido adiposo subcutáneo en la región dorso-lateral posterior de rata Wistar, se consideró una localización sencilla, segura y abundante para la obtención del mismo, sin que el acto quirúrgico haya ocasionado morbilidad o mortalidad, obteniendo un peso medio de muestra de tejido adiposo de 3 gramos.

El método de obtención y aislamiento de las MSCat se realizó por digestión enzimática con Colagenasa tipo I al 0.01%. Los cultivos se observaron diariamente en el microscopio óptico invertido Axio Vert.A1 ZEISS ®; a las 48 horas de cultivo se observaron células adherentes a la superficie del plástico y las células no adherentes se retiraron en el primer lavado y cambio de medio realizado a las 72 horas (figura 21).

Se obtuvieron un total de 4 muestras de tejido adiposo, se sometieron a procedimiento de aislamiento anteriormente descrito, que permitió en todas las muestras una eficaz obtención de células MSCat con la fracción vascular del estroma y viable para su uso.

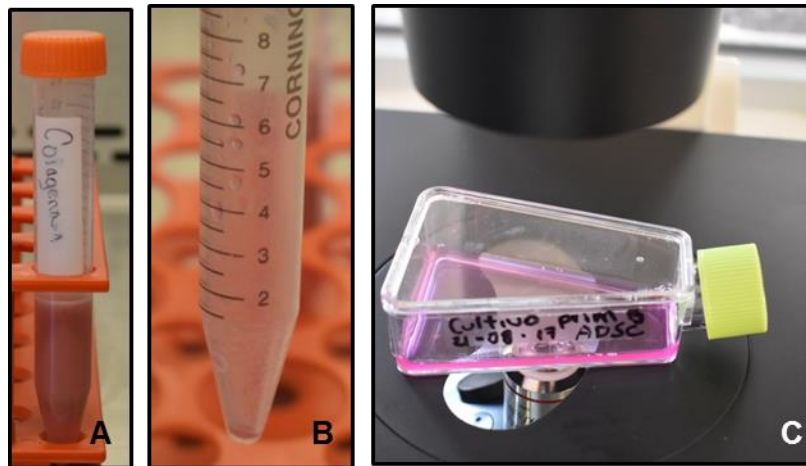


Figura 21: Fotografías del proceso de aislamiento celular con el uso de Colagenasa I: A) digestión enzimática; B) obtención de la fracción vascular; C) cultivo primario.

9.2.1 Características del cultivo.

La adhesión celular de las MSCat al plástico de cultivo en el cultivo primario se observó, prácticamente a las 48 horas. Morfológicamente, las células se caracterizaron como células alargadas en forma de huso, adheridas al sustrato, con características similares a los fibroblastos; con un núcleo grande y central, con prolongaciones de su citoplasma. Además, formaron una organización similar a las CFU-F (Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastos), manteniendo esta morfología coincidente durante los diferentes subcultivos realizados, donde manifestaron una morfología más homogénea, fusiforme, con crecimiento rápido que ocupaba toda la superficie del frasco. En lo que respecta al rendimiento celular, este se observó amplio pues en cada expansión los cultivos alcanzaron la confluencia del 80% entre los 7 a 8 días de cultivo en el cultivo primario y en los siguientes pases fue cada 3er a 4to día sembrando siempre 10^4 células.

Se realizaron fotografías a diferentes días, en donde se muestra el crecimiento del cultivo primario Fb (control) donde se observa la presencia de las primeras células entre los días 4 al 5 (figura 22), en comparación con el cultivo experimental MSCat (figura 23) que la adhesión de las primeras células solo requirió de 2 días.

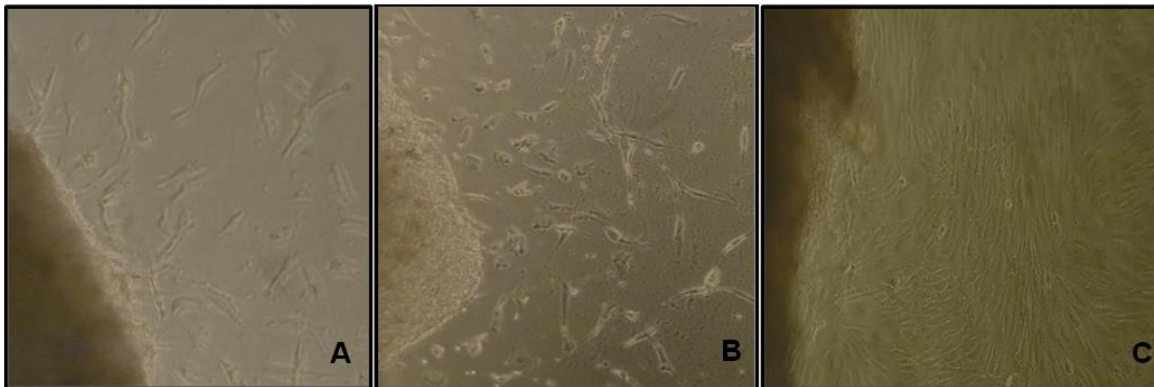


Figura 22: Fotografías al microscopio invertido del cultivo primario de Fb: A) 5 días; B) 7 días; C) 10 días. Tomadas a aumento 10X.

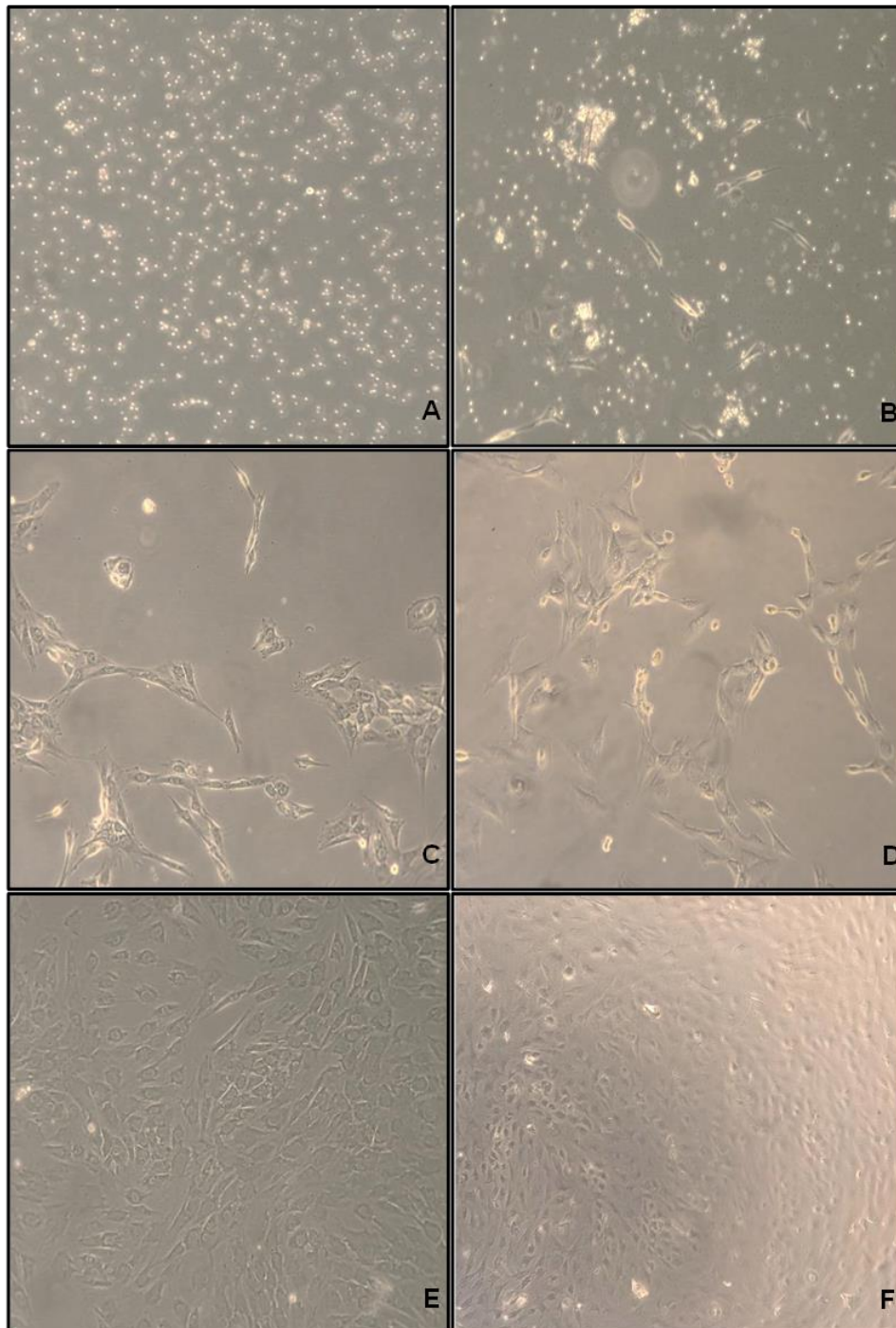
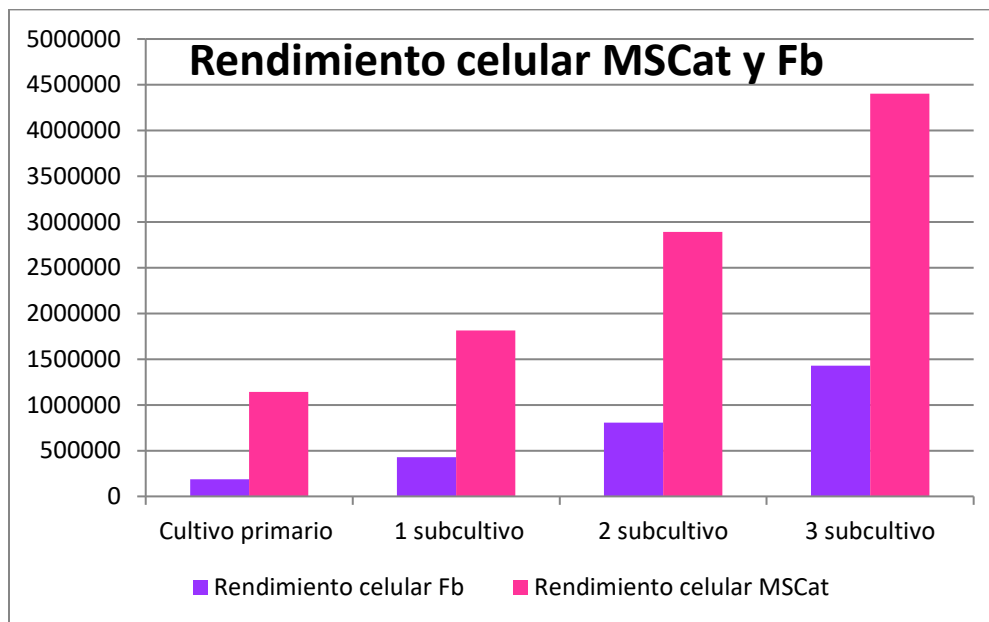


Figura 23: Fotografías tomadas en el microscopio óptico invertido del cultivo primario de los cultivos de MSCat: A) 0 horas; B) 48 horas; C) 3 días; D) 5 días; E) 8 días; F) 10 días. Tomadas a aumento 10X.

9.2.2 Rendimiento del cultivo.

La capacidad de división celular de las MSCat fue comparada con la población de fibroblastos, esto se realizó con la técnica de conteo en cada subcultivo con el azul de tripano. Se calculó el porcentaje de células viables, que fue significativamente mayor en las MSCat comparando con los Fb. También, se pudo observar en los subcultivo, que las poblaciones de MSCat se pudieron mantener de manera favorable durante al menos 8 subcultivos o pases más que los Fb.

Obtuvimos un margen de 1.14×10^6 células a partir de 3g de tejido graso entre los 7 y 9 días en cultivo primario, alcanzando cifras de 4.4×10^6 en el tercer subcultivo como se puede observar en la gráfica 1. En comparación al rendimiento celular de los Fb con los que se obtuvo un margen de 1.8×10^5 en el cultivo primario y de 1.4×10^6 en el tercer subcultivo (gráfica 2).



Gráfica 2: Rendimiento celular de las MSCat comparadas con los cultivos de los Fb desde el cultivo primario al tercer subcultivo.

9.2.3 Diferenciación osteogénica.

En el proceso de inducción al linaje osteogénico *in vitro* de las MSCat por adición de medio de cultivo osteogénico, fue evaluado mediante fotografías en el microscopio óptico invertido Axio Vert.A1 ZEISS ® en los días: 3, 7, y 14 donde se comparó lo ocurrido morfológicamente entre las placas de cultivos comparando con los cultivos de Fb con y sin medio osteogénico (figura 24); con los cultivos de MSCat (figura 25). Los grupos de estudio son: medio de cultivo basal (para las MSCat D/MEM y para los Fb medio de cultivo F-12), con medio osteogénico y medio osteogénico con ASA.

Los cambios observados en la morfología celular mostraron que las células MSCat se modificaron, ya que, de tener una forma fibroblástica y elongada comenzaron a presentar morfología con características poligonales, aumento de tamaño. También se notó una disminución en la división celular, observando esta diferencia marcada a partir de los 3 días de cultivo en el medio osteogénico, en los que el número de células disminuyó.

En las MSCat cultivadas en medio osteogénico con ASA, se observó que mantuvieron su morfología inicial y solo al término de 14 días se observaron con forma ligeramente más estrellada, de menor tamaño y no presentaron una división celular notoriamente disminuida como el caso de las MSCat solo con medio osteogénico.

Los constructos que se realizaron con células MSCat sembradas en el andamio de PLA, no se observaron de manera definida o contrastante y fueron difíciles de enfocar en el microscopio invertido. Aun así, se consiguió realizar fotografías de los laterales de los constructos, en donde las fibras del mismo se observaron adheridas al portaobjetos, y se demostró que las células fueron capaces de sobrevivir, distribuirse, dividirse y diferenciarse a través de las fibras de PLA, sin que esté afectará su morfología y sobrevivencia (figura 26).

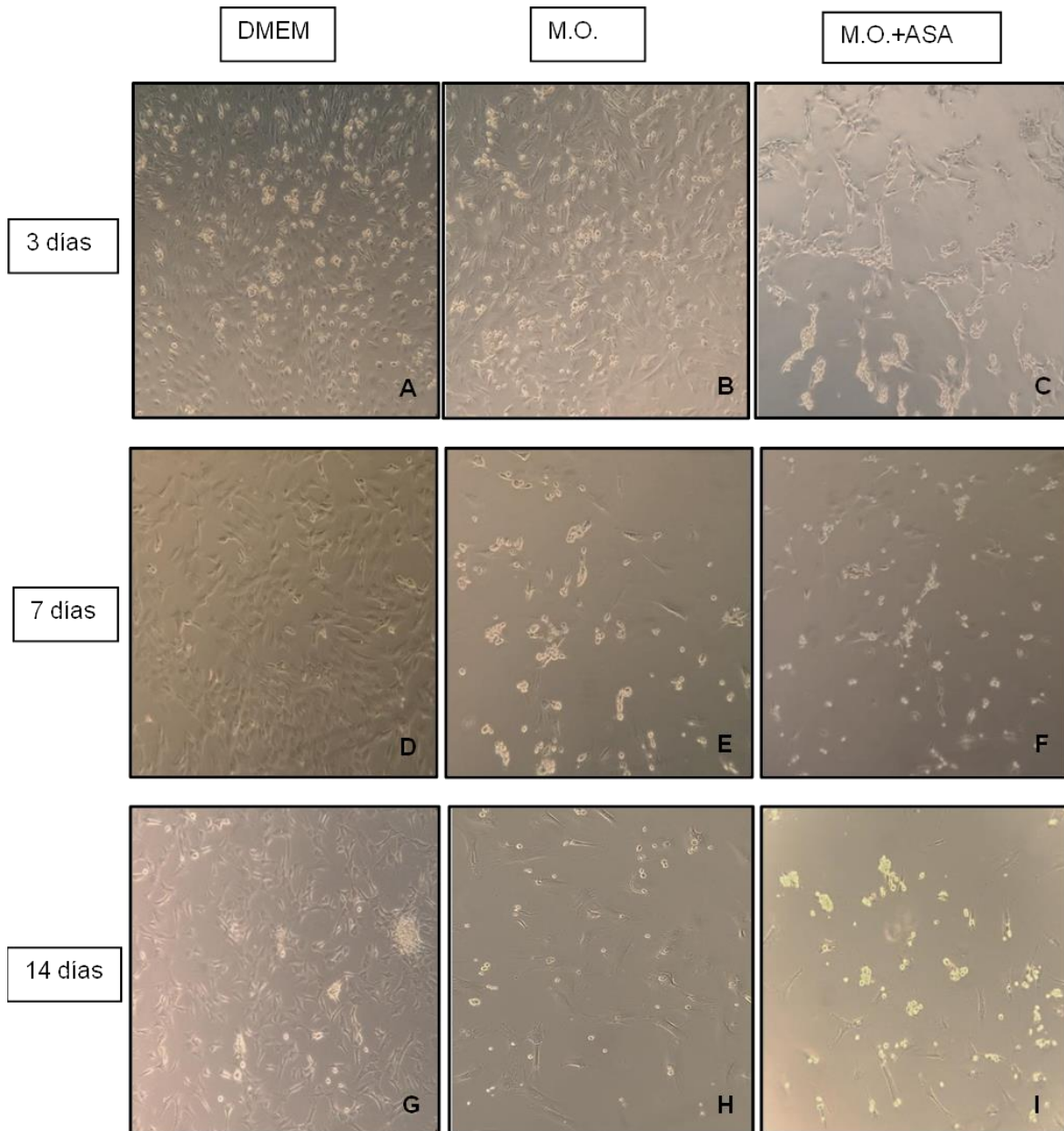


Figura 24: Fotografías tomadas en microscopio óptico invertido en el tercer subcultivo de Fb en los diferentes grupos de estudio con los diferentes medios de cultivo y a diferentes días: A) 3 días en D/MEM; B) 3 días en M.O.; C) 3 días en M.O.+ASA; D) 7 días en D/MEM; E) 7 días en M.O.; F) 7 días en M.O.+ASA; G) 14 días en D/MEM; H) 14 días en M.O.; I) 14 días en M.O.+ASA. Tomadas a aumento 10X.

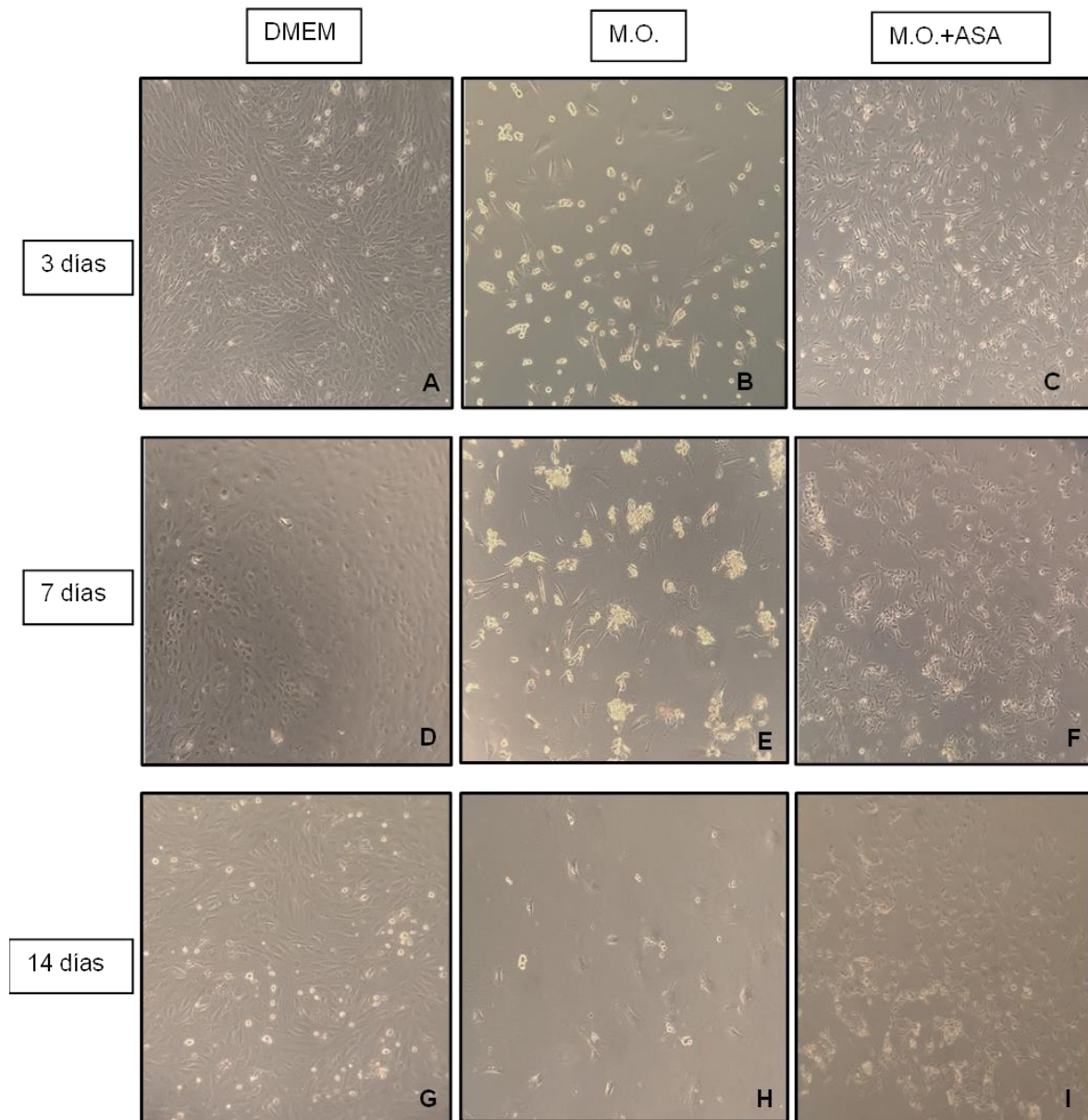


Figura 25: Fotografías tomadas en el microscopio óptico invertido en el tercer subcultivo de MSCat en diferentes grupos de estudio con los diferentes medio de cultivo y a diferentes días: A) 3 días en D/MEM; B) 3 días en M.O.; C) 3 días en M.O.+ASA; D) 7 días en D/MEM; E) 7 días en M.O.; F) 7 días en M.O.+ASA; G) 14 días en D/MEM; H) 14 días en M.O.; I) 14 días en M.O.+ASA. Tomadas a aumento 10X.

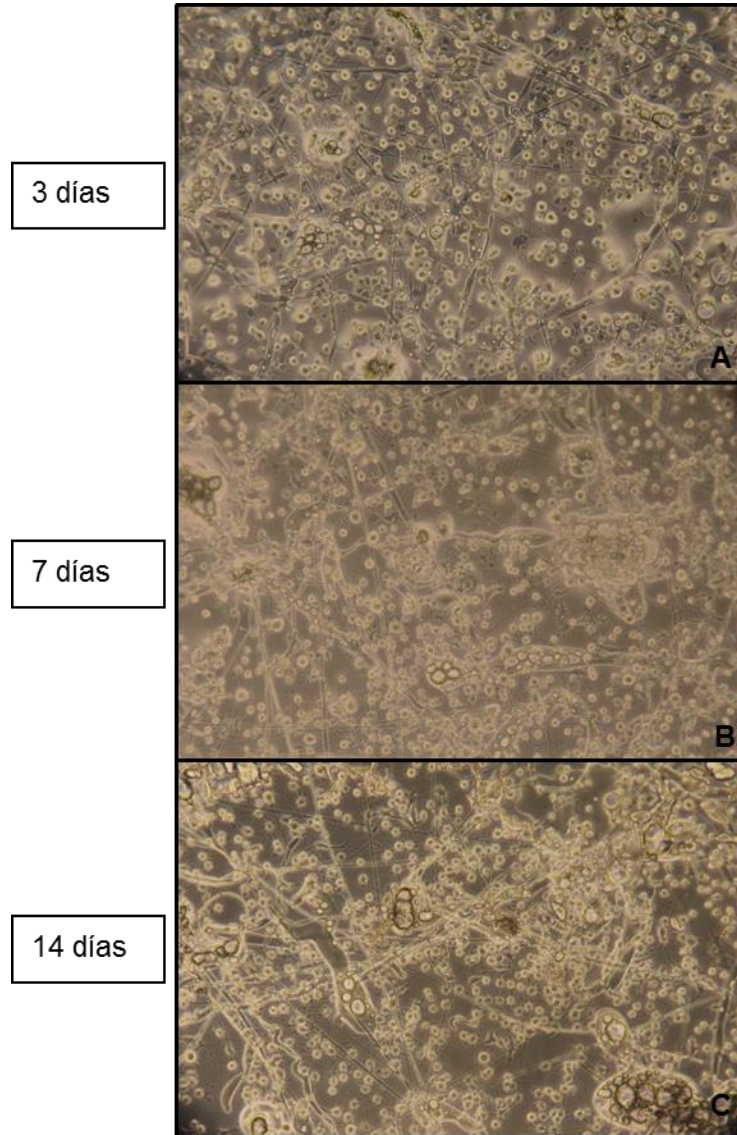


Figura 26: Fotografías al microscopio invertido de los constructos de PLA y MSCost a diferentes días de cultivo: A) 3 días; B) 7 días; C) 14 días .Tomadas a aumento 10X.

9.4 Inmunofluorescencia.

La diferenciación celular también se examinó mediante la técnica de inmunofluorescencia para observar el marcaje para Osteocalcina (Oc). Las imágenes de fluorescencia demostraron que las células cultivadas en la superficie de los andamios de PLA mantuvieron su morfología de acuerdo al medio de cultivo (D/MEM, M.O. y M.O.+ASA) ya sea fibroblastoide, forma poligonal o estrellada y exhibieron una adherencia y migración dentro del biomaterial. El marcaje para Oc fue positivo en el control realizado en hueso de mandíbula de rata y de igual manera, fue observado en el grupo MSCost con medio osteogénico, también se observó marcaje positivo para Oc pero en menor cantidad e intensidad en el grupo medio osteogénico con ASA, siendo más evidente el marcaje en las observaciones hechas a mayores aumentos (figuras 27 y 28). Empleamos como control fibroblastos, en los que no se observó marcaje. También, observamos marcaje positivo en los constructos de los grupos: MSCost y MSCost con ASA a 14 días (figura 29).

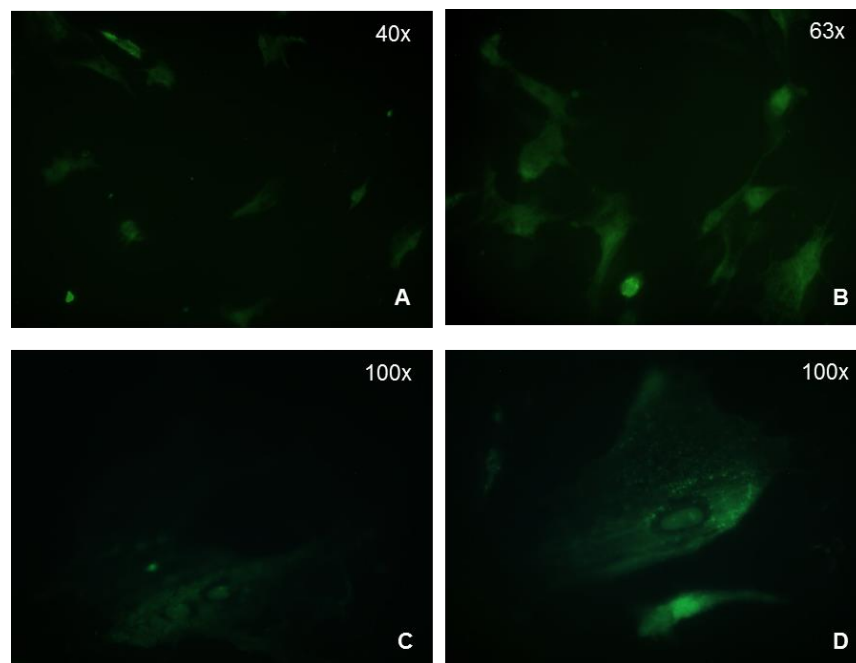


Figura 27: Fotografías tomadas con microscopia de fluorescencia del marcaje a Oc (FITC = verde) en los cultivos en el grupo MSCat en M.O. + ASA a diferentes aumentos: A) 40x; B) 63x; C) y D) 100x.

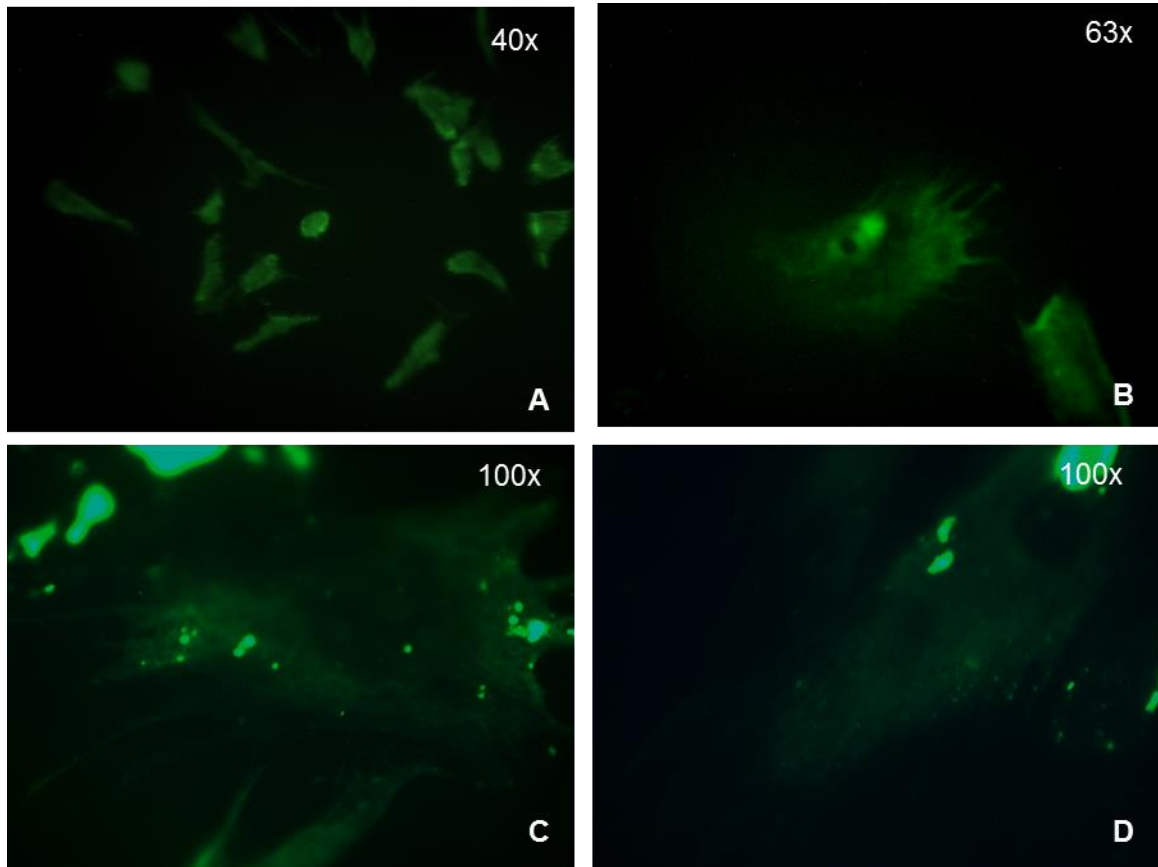


Figura 28: Fotografías tomadas con microscopia de fluorescencia del marcaje a Oc (FITC = verde) en los cultivos en el grupo MSCat + M.O. a diferentes aumentos: A) 40x; B) 63x; C) y D) 100x.

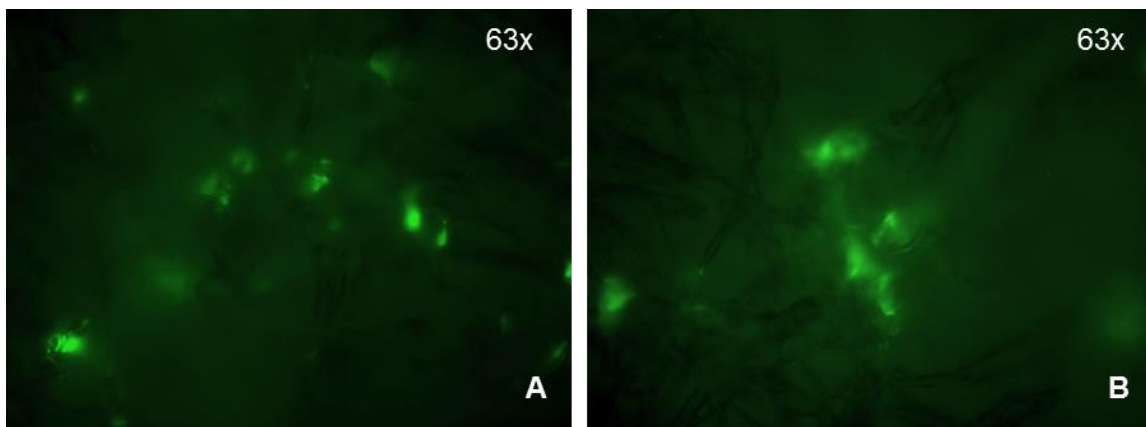


Figura 29: Fotografías tomadas con microscopia de fluorescencia del marcaje a Oc (FITC = verde) en los cultivos en el grupo del marcaje a Oc en los constructos: A) PLA y MSCat +M.O.; y B) PLA; C) MSCat M.O. + ASA. Aumento a 63X.

9.5 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

El estudio mediante MEB observamos que el PLA es un material compuesto por fibras de un grosor promedio de 599 nm, en el que las células MSCat y MSCost se adhirieron, distribuyeron y se mantuvieron en cultivo durante 14 días e incluso migraron al interior del poro.

Las células MSCat indiferenciadas, solo con D/MEM, y diferenciadas con M.O. durante 14 días, se observó que se adhirieron, migraron al interior del poro de los andamios de PLA y formaron colonias dentro de los constructos.

Cuando comparamos los dos tipos de constructos realizados observamos que en los constructos con MSCat indiferenciadas se observó que la cantidad de células fue menor (figura 30) que en los constructos del grupo MSCost, ya que en los constructos sembrados con estas células se observaron colonias de mayor densidad que se encontraban formando placas semejando a la matriz extracelular (figura 31). Además, se observó que las células presentes en los constructos con M.O. aumentaron en tamaño y su morfología también cambio.

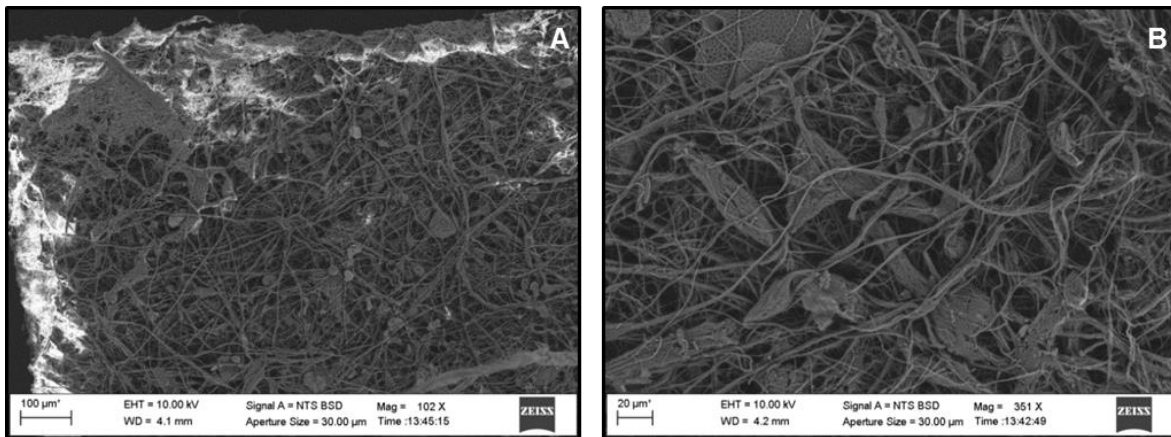


Figura 30: Fotografías tomadas con MEB de los constructos en D/MEM: A) distribución celular; B) morfología y migración al interior del poro.

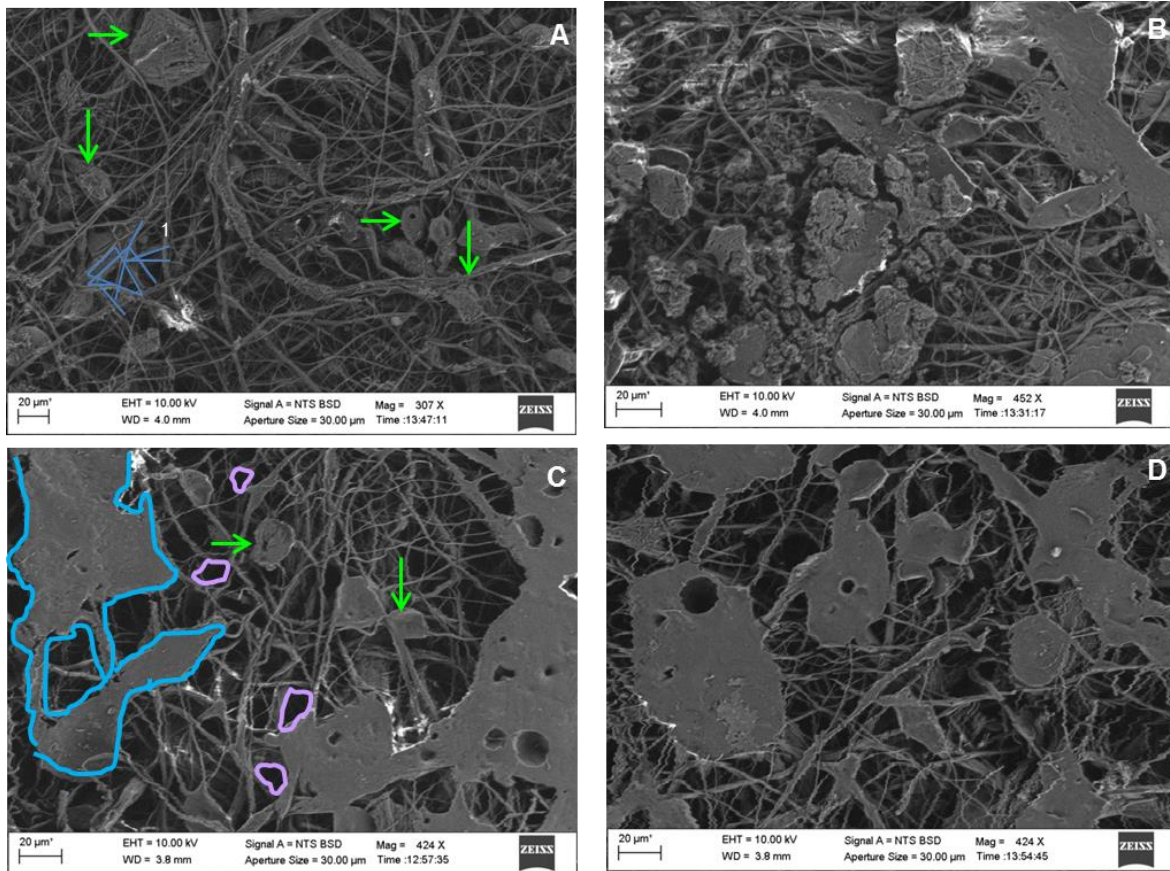


Figura 31: Fotografías tomadas con MEB de los constructos en M.O. Las flechas en color verde muestran las células, los contorneados en lila muestran los poros, el contorneado azul muestra el conjunto celular semejando la matriz extracelular, 1 muestra el hilado del andamio; A) y B) se observa la distribución y migración de las células dentro de los poros; C) y D) se observa una estructura que asemeja a matriz extracelular distribuyéndose por el andamio.

9.6 Degradación *in vivo* de PLA.

En el análisis histológico se observó que a los 7 días el andamio aún está presente, en el área del andamio se observó ligero infiltrado inflamatorio mononuclear compuesto por linfocitos y se observó una cápsula densa de tejido conectivo con edema intersticial. A los 14 días el andamio de PLA se encuentra integrado, no se observa infiltrado inflamatorio y el biomaterial se mantuvo estable (figura 32).

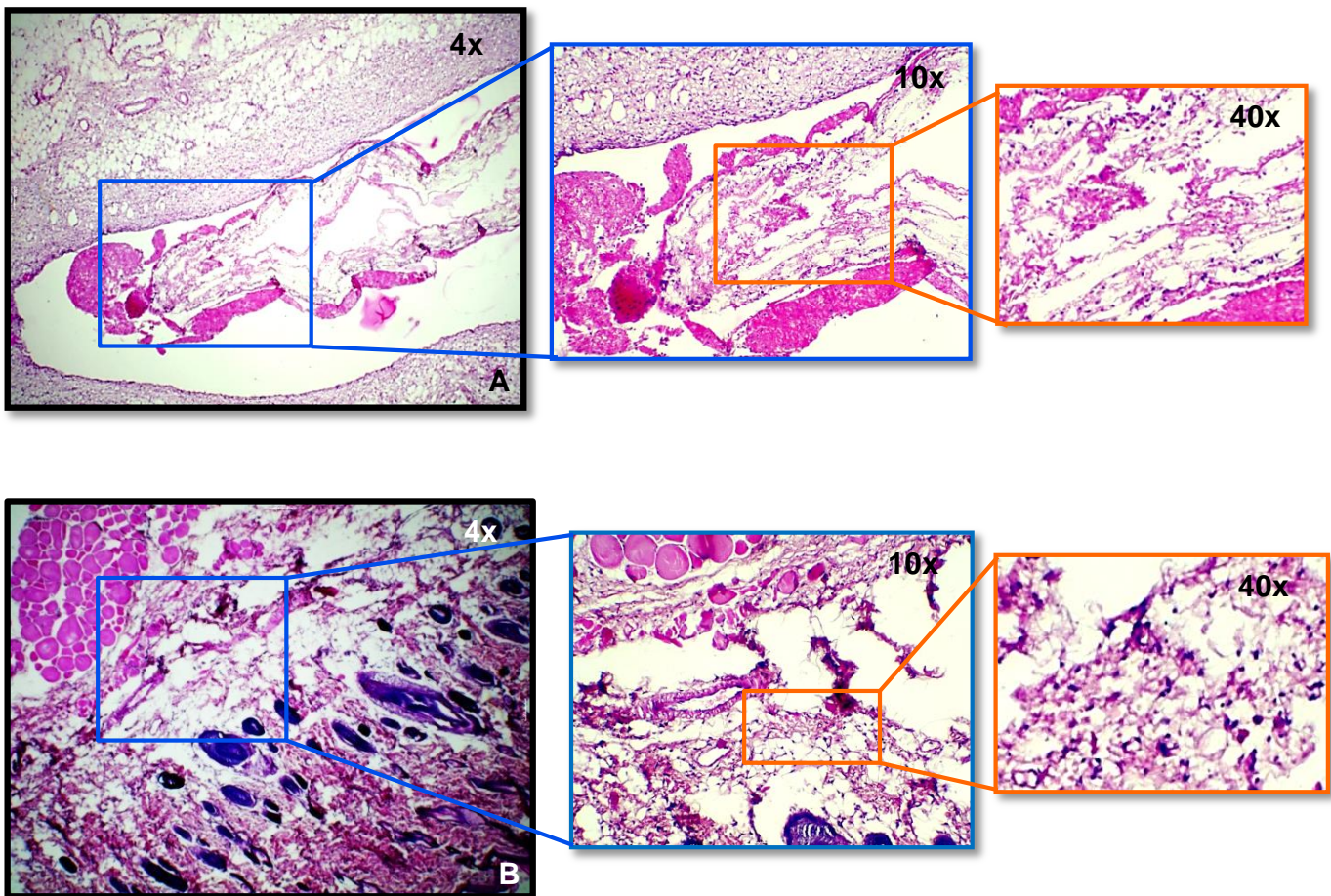


Figura 32: Fotografías tomadas en microscopio óptico del andamio de PLA después de su implantación en la piel: A) 7 días, se observa el biomaterial e infiltrado inflamatorio; B) 14 días no se aprecia infiltrado inflamatorio y el biomaterial aún se aprecia. Tinción H&E y aumentos 4x, 10x y 40x.

10 DISCUSIÓN

La Ingeniería de Tejidos Óseos, de forma óptima requiere de la elaboración de constructos citocompatibles para promover la regeneración. El constructo que realizamos en la presente tesis consta de: un andamio, células MSCat y moléculas de señalización contenidas en el medio de cultivo osteogénico, que tenían por objetivo promover la osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción (Matsuno, 2010) (Perán, 2013).

El andamio utilizado fue hecho de PLA al 10% mediante técnica de electrohilado, que en estudios previos realizados por Martínez y cols. (Martínez, 2017) y Granados-Hernández y cols. (Granados-Hernández, 2017), demostraron ser altamente biocompatibles *in vitro* en dos versiones PLA 6% y PLA 10%; en nuestro estudio corroboramos que el andamio de PLA 10% mostró ser bien tolerado por las MSCat, además, de que al poner el medio de diferenciación al linaje osteogénico mostramos características compatibles con un alto grado de osteoconducción (Lee, 2012).

Los andamios de PLA observados al microscopio óptico invertido mostraron que no se degradó *in vitro* a los 14 días. Para la degradación *in vivo* los andamios PLA mostraron ser histológicamente compatibles, ya que se integró con el tejido sin presentar inflamación; al respecto en estudios previos, se demostró que no se degrada aún a 100 días, tal como lo reportó Granados-Hernández y cols. (Granados-Hernández, 2017) que lo evaluaron histológicamente en concentraciones de 7% y 10%, sin embargo ellos observaron infiltrado inflamatorio y formación de tejido conectivo fibroso denso, fibras de colágeno organizadas e infiltrado linfocítico; y concluyeron que las nanofibras del PLA, independientemente de la concentración del polímero (7% y 10%) no demostraron evidencia de toxicidad histológicamente después de 100 días.

En nuestro constructo decidimos usar MSCat ya que son células que se caracterizan por la habilidad de proliferación, auto-renovación y diferenciación en

líneas celulares como: adipogénicas, osteogénicas, condrogénicas, miogénicas y neurogénicas *in vitro* (Hu, 2018) (Yamachika, 2013) (Bianchi de Di Risio, 2004) (Zuk, 2002).

En adición, el tejido adiposo subcutáneo es un tejido abundante, fácilmente extraíble y contiene abundantes poblaciones de MSCat, mostrando un crecimiento estable en cultivo (Zuk, 2002). Se ha demostrado que las MSCat cumplen los criterios para ser clasificadas como células troncales mesenquimales (Gimble, 2007); pudimos comprobar que se encuentran en cantidades abundantes, que son aislables de forma poco invasiva, altamente diferenciables, trasplantables de forma autóloga y heterólogas. Considerando la incidencia de obesidad en la población actual, el tejido adiposo representa una fuente realmente abundante y accesible. En la presente tesis se logró el aislamiento de MSCat en el 100% de las biopsias realizadas, en la que inicialmente se obtuvieron 3g en promedio de tejido. Comparando el tejido adiposo con otras fuentes de obtención de células mesenquimales podemos observar que, por ejemplo, en el cordón umbilical solo se reporta un 30% de éxito de extracción celular, teniendo una adherencia que varía desde las 2 a 4 semanas; en las BMSCs de la médula ósea el éxito de aislamiento reportado es del 100% de las biopsias de las que las células adherentes son en promedio 87% menos que las células obtenidas de tejido adiposo; y que su capacidad de diferenciación al linaje osteogénico ha sido reportada de 71.4%, mientras que en las MSCat la diferenciación reportada ha sido del 78.8% (Arévalo Romero, 2016).

Publicaciones realizadas por Ji y cols. así como Hu y cols. (Ji, 2013) y (Hu, 2018) han demostrado que las MSCat tienen la capacidad de diferenciarse al linaje osteogénico a 21 días en promedio y nosotros hemos logrado observar cambios de diferenciación desde los 7 y hasta los 14 días; tiempo de estudio en el que observamos a las células cambiar su morfología fibroblastoide a una morfología poligonal de mayor tamaño. El contenido del medio osteogénico proporciona las

células el microambiente necesario para su inducción al linaje óseo. La dexametasona estimula la proliferación de las MSCs y permite su diferenciación hacia el linaje osteogénico. El β -glicerol fosfato da un soporte a la osteogénesis mediante la mineralización y la actividad de los pre-osteoblastos. El ácido ascórbico incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina y promueve la producción de osteocalcina así como la mineralización de la matriz (Pineda Molina, 2009). La diferenciación de MSCat en M.O. mostró una mayor estabilidad en el cultivo y la proliferación celular se mantuvo más estable en comparación con M.O.+ ASA 1mM. Al respecto, Abd Rahman y cols. reportaron que la ASA a 1mM modula la capacidad proliferativa y el potencial osteogénico de células mesenquimales obtenidas a partir del ligamento periodontal (PDLSCs); sin embargo en nuestras pruebas con las MSCat no nos fue posible observar estos beneficios potenciales, ya que la morfología de las células no tuvo cambios significativos y el marcaje para Oc fue menor (Abd Rahman, 2016).

Los andamios deben de proporcionar el apoyo necesario para que las células proliferen y mantener su función diferencial (Tajbakhsh, 2017), por lo que un andamio que será usado en la ITO deberá, además poseer las características necesarias que lo hagan funcional para el tejido en donde será implantado (hueso); por lo que debe ser tridimensional, poseer una red interconectada de poros que faciliten el crecimiento, flujo y transporte de nutrientes, así como de residuos metabólicos, ser biocompatible, bioabsorbible, poseer una superficie químicamente adecuada para la fijación, proliferación y diferenciación celular. Nuestro andamio de PLA demostró poseer las características adecuadas para ser parte de nuestro constructo en ITO, ya que lo observamos como un andamio altamente biocompatible con las células MSCat y los Fb, ya que a los 14 días, las células se adhirieron, se distribuyeron dentro del PLA manteniendo su viabilidad, su capacidad de división y proliferación. En adición a esto, en nuestro análisis por MEB a los 14 días del cultivo, en nuestros constructos observamos a las células MSCat y MSCost con una morfología estirada con prolongaciones citoplasmáticas,

en forma de huso en el caso de MSCat y forma poligonal en MSCost y sin presencia de apoptosis. Las células migraron al interior de los poros del PLA, formando colonias y en el caso de las células MSCost, también produjeron una matriz extracelular con características de mineralización similares al tejido osteoide.

11 CONCLUSIONES

La población celular obtenida MSCat mostro características de MSC, ya que presentaron adherencia a la superficie del cultivo, capacidad proliferativa y capacidad de diferenciación al linaje osteogénico, tanto en los frascos de cultivos como sobre los andamios de PLA.

Los andamios de PLA sometidos a degradación demostraron que se mantuvieron estables *in vitro* a 14 días y mostraron citocompatibilidad con las células. Durante las pruebas *in vivo* no se observó su degradación a los 14 días y los constructos (PLA+células+M.O.) se integraron con los tejidos sin evidencia de inflamación y se mantuvieron estables.

Los constructos realizados de PLA y MSCat, así como de PLA y MSCost se observaron citocompatibles en todos los casos, y en especial, en el constructo MSCost 14 días mostro propiedades osteoconductoras, por lo que puede ser el candidato óptimo para promover la regeneración ósea como herramienta de la Ingeniería de Tejidos.

12 BIBLIOGRAFIA

- Abd Rahman, F. M. (2016). Aspirin Enhances Osteogenic Potential of Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSCs) and Modulates the Expression Profile of Growth Factor–Associated Genes in PDLSCs. . *Journal of periodontology*, 87(7), 837-847.
- Alvarez Barreto, J. F. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. . *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2).
- Arévalo Romero, J. A. (2016). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas.
- Bianchi de Di Risio, C. C. (2004). Células mesenquimales de médula ósea: diferenciación y potencial reemplazo neuronal. . *Medicina (Buenos Aires)*, 64(6), 543-549.
- Bibbo, C. N. (2015). Bone morphogenetic proteins: Indications and uses. . *Clinics in podiatric medicine and surgery*.
- Dargaville, B. L.-W. (2013). Electrospinning and crosslinking of low-molecular-weight poly (trimethylene carbonate-co-l-lactide) as an elastomeric scaffold for vascular engineering. *Acta biomaterialia*, 9(6), 6885-6897.
- Farah, S. A. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—a comprehensive review. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 367-392.
- Fraser, J. K. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 24(4), 150-154.
- Friedenstein, A. J.-B. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17(4), 331-340.
- Gimble, J. M. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. . *Circulation research*, 100(9), 1249-1260.
- Granados-Hernández, M. V.-B.-G.-V.-F.-P. (2017). In vitro and in vivo biological characterization of poly (lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*.
- Guzman-Urbe, D. A.-E.-P.-A.-A.-I. (2017). Oral mucosa: an alternative epidermic cell source to develop autologous dermal-epidermal substitutes from diabetic subjects. . *Journal of Applied Oral Science*, 25(2), 186-195.
- Hu, L. Y. (2018). Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 360.
- Ji, W. Z. (2013). Biocompatibility study of a silk fibroin-chitosan scaffold with adipose tissue-derived stem cells in vitro. . *Experimental and therapeutic medicine.*, 6(2), 513-518.

- Kim, Y. L. (2016). Comparison of osteogenesis between adipose-derived mesenchymal stem cells and their sheets on poly--caprolactone/-tricalcium phosphate composite scaffolds in canine bone defects. *Stem cells international*.
- Lee, H. Y. (2012). Novel porous scaffolds of poly (lactic acid) produced by phase-separation using room temperature ionic liquid and the assessments of biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(5), 1271-1279.
- Liang, H. L. (2014). A novel strategy of spine defect repair with a degradable bioactive scaffold preloaded with adipose-derived stromal cells. . *The Spine Journal*, 14(3), 445-454.
- Lizarbe, M. A. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev R Acad Cienc Exact Fís Na*, 10(1), 227-249.
- Martínez, M. F. (2017). *Utilización de polímeros de ácido poliláctico (PLA) como tratamiento en defectos óseos mandibulares en un modelo experimental con ratas*. México: FES IZTACALA, UNAM.
- Masoumeh, F. a. (2010). Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue and Cell*, 42, págs.211–216.
- Matsuno, T. O. (2010). Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery. *Japanese Dental Science Review*, 46(2), 188-192.
- Melek, L. N. (2015). Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. *Tanta Dental Journal*, 12(3), 211-223.
- Meruane, M. &. (2011). Células troncales derivadas del tejido adiposo: Técnica de obtención y utilidad en cirugía. *Revista chilena de cirugía*, 63(2), 223-228.
- Moreno-Aliaga, M. J. (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor.
- Perán, M. G.-R. (2013). How can nanotechnology help to repair the body? Advances in cardiac, skin, bone, cartilage and nerve tissue regeneration. . *Materials*, 6(4), 1333-1359.
- Pineda Molina, C. &. (2009). Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. *Revista Ingeniería Biomédica*, 3(5), 58-65.
- Pulido, F. G. (2013). El uso de BMP-2 en Traumatología: avances en ingeniería tisular. *Actualidad médica* , 154-159.
- Rai, R. R. (2015). Tissue engineering: step ahead in maxillofacial reconstruction. . *Journal of international oral health: JIOH* , 7(9), 138.
- Ramot, Y. H.-Z. (2016). Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. . *Advanced drug delivery reviews*, 107, 153-162.

- Rodríguez-Pardo, V. M.-L.-C. (2010). Aislamiento y caracterización de células" stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. . *Universitas Scientiarum*, 15(3), 224-239.
- Sabino, M. A. (2017). TÉCNICAS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS CON APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS. *La Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, RLMM*, 37(2).
- Saini, P. A. (2016). Poly (lactic acid) blends in biomedical applications. . *Advanced drug delivery reviews*, 107, 47-50.
- Sakamoto, M. M. (2017). Cultured Human Epidermis Combined With Meshed Skin Autografts Accelerates Epithelialization and Granulation Tissue Formation in a Rat Model. . *Annals of plastic surgery*, 78(6), 651–658.
- Salehi, P. M. (2017). Extract of mouse embryonic stem cells induces the expression of pluripotency genes in human adipose tissue-derived stem cells. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(11), 1200.
- Serna, L. &. (2011). Ácido poliláctico (PLA): Propiedades y aplicaciones. *Ingeniería y competitividad*, 5(1), 16-26.
- Shen, X. Z. (2016). Sequential and sustained release of SDF1 and BMP2 from silk fibroin nanohydroxyapatite scaffold for the enhancement of bone regeneration. *Biomaterials*, 106, 205-216.
- Shen, X. Z. (2016). Sequential and sustained release of SDF-1 and BMP-2 from silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for the enhancement of bone regeneration. *Biomaterials. ELSEVIER*.
- Sierra-García, G. D.-R.-H.-A.-M. (2016). Proteínas morfogenéticas óseas (BMP): aplicación clínica para reconstrucción de defectos en hueso. . *Gac Med Mex*.
- Su, C. J. (2017). Calcium silicate/chitosan-coated electrospun poly (lactic acid) fibers for bone tissue engineering. *Materials.*, 10(5), 501.
- Syed, O. W. (2014). Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 10(12), 5043-5054.
- Syed, O. W. (2014). Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 10(12), 5043-5054.
- Syed, O. W. (2014). Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 10(12), 5043-5054.

- Tajbakhsh, S. &. (2017). A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly (lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, 70, 897-912.
- Tsou, C. H. (2015). Biocompatibility and characterization of polylactic acid/styrene-ethylene-butylene-styrene composites. . *Bio-medical materials and engineering*, 26(1), S147-S154.
- Tyler, B. G. (2016). Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 163-175.
- Walsh, S. J. (2001). High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology*, 40(1), 74-83.
- Wang, X. L. (2017). Biocompatibility of biological material polylactic acid with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Biomedical reports.*, 6(5), 519-524.
- Xiao, L. W. (2012). Poly (lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications. In *Biomedical science, engineering and technology. InTech*.
- Xu, Y. F. (2015). A tissue-specific scaffold for tissue engineering-based ureteral reconstruction. *PloS one*, 10(3).
- Yamachika, E. &. (2013). Bone regeneration from mesenchymal stem cells (MSCs) and compact bone-derived MSCs as an animal model. . *Japanese Dental Science Review*, 49(1), 35-44.
- Yudhó, Z. R. (2017). *Terapia con células troncales mesenquimales autólogas de tejido adiposo en un defecto mandibular en un modelo de rata Wistar*. México: FES IZTACALA, UNAM.
- Zhang, J. W. (2015). In vivo regeneration of renal vessels post whole decellularized kidneys transplantation. . *Oncotarget*, 6(38), 40433.
- Zuk, P. A. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, , 13(12), 4279-4295.

13 CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la Ingeniería de Tejidos, tomado de la página de CONACyT.	12
Figura 2: Esquema de biomateriales usados en la Ingeniería de Tejidos: A) metales; B) cerámicas; C) vidrios; D) polímeros; E) tejidos biológicos modificados.	14
Figura 3: Esquema del ciclo del PLA en el medio ambiente como: la fermentación, la síntesis, el tratamiento y degradación (Xiao, 2012).	16
Figura 4: Esquema del procedimiento de electrohilado (Gupta, 2014).	17
Figura 5: Esquema de la distribución de grasa blanca y parda (modificado de Gesta y cols. 2007).	20
Figura 6: Esquema de la diferenciación de células troncales mesenquimales (Hu, 2018).	21
Figura 7: Imagen de esterilización del PLA en la cámara de UV.	31
Figura 8: Imagen de placa de multipocillos con los andamios PLA a las 24 horas en: A) PBS 1x; B) D/MEM suplementado; C) Colagenasa; D) Tripsina 0.25%.	32
Figura 9: Imagen del procedimiento quirúrgico de extracción de piel.	34
Figura 10: Imágenes del procedimiento <i>in vitro</i> para el aislamiento de Fb a partir de explantos de dermis: A) biopsia de piel en lavado con HBSS 1X; B) separación de la epidermis y la hipodermis para la obtención de la dermis y obtención de los explantos; C) explantos sembrados en frascos de cultivo.	35
Figura 11: Imagen del procedimiento quirúrgico de la obtención de las biopsias de tejido adiposo subcutáneo.	36
Figura 12: Imágenes del procedimiento <i>in vitro</i> para el aislamiento de células MSCat del tejido adiposo subcutáneo: A) lavado del tejido con HBSS 1X; B) disgregación mecánica bisturí del #11; C) digestión enzimática con Colagenasa 1; D) filtrado en malla de nylon de 100µm de poro; E) centrifugación; F) cultivo primario.	38
Figura 13: Imagen del conteo celular en cámara de Neubauer: A) montaje celular por capilaridad; B) es el grabado de la cámara (hematocitómetro) en la que se cuentan los cuadrantes en azul por el tamaño celular; C) esquema del recuadro de recuento en donde solo contamos las células blancas o brillantes y se marcan como células no viables las células teñidas de azul.	40
Figura 14: Imagen del sembrado celular sobre los cubreobjetos y los andamios de PLA.	41
Figura 15: Imagen de fijación de muestras con paraformaldehído al 3% y lavados posteriores con PBS 1x.	42
Figura 16: Imágenes de proceso de Inmunofluorescencia de multipocillos (experimental) y portaobjetos (control positivo y negativo).	44
Figura 17: Imagen de constructos de PLA metalizados.	46
Figura 18: Procedimiento quirúrgico para la implantación de los andamios de PLA <i>in vivo</i> : A) medición e incisión; B) apertura en sobre con disección roma; C) implante del andamio de PLA; D) sutura de la herida; E) y F) biopsia de la piel después del tiempo de estudio.	47
Figura 19: Fotografías macroscópicas de los andamios de PLA durante el estudio de degradación.	48
Figura 20: Fotografías tomadas en el microscopio invertido a aumento de 10X de los andamios de PLA: A) 3 días en PBS; B) 3 días en D/MEM; C) 3 días en Tripsina; D) 3 días en Colagenasa; E) 7 días en PBS; F) 7 días en D/MEM; G) 7 días en Tripsina; H) 7 días en Colagenasa; I) 14 días en PBS; J) 14 días en D/MEM; K) 14 días en Tripsina; L) 14 días en Colagenasa.	50
Figura 21: Fotografías del proceso de aislamiento celular con el uso de Colagenasa I: A) digestión enzimática; B) obtención de la fracción vascular; C) cultivo primario.	51
Figura 22: Fotografías al microscopio invertido del cultivo primario de Fb: A) 5 días; B) 7 días; C) 10 días. Tomadas a aumento 10X.	52

Figura 23: Fotografías tomadas en el microscopio óptico invertido del cultivo primario de los cultivos de MSCat: A) 0 horas; B) 48 horas; C) 3 días; D) 5 días; E) 8 días; F) 10 días. Tomadas a aumento 10X.	53
Figura 24: Fotografías tomadas en microscopio óptico invertido en el tercer subcultivo de Fb en los diferentes grupos de estudio con los diferentes medios de cultivo y a diferentes días: A) 3 días en D/MEM; B) 3 días en M.O.; C) 3 días en M.O.+ASA; D) 7 días en D/MEM; E) 7 días en M.O.; F) 7 días en M.O.+ASA; G) 14 días en D/MEM; H) 14 días en M.O.; I) 14 días en M.O.+ASA. Tomadas a aumento 10X.	56
Figura 25: Fotografías tomadas en el microscopio óptico invertido en el tercer subcultivo de MSCat en diferentes grupos de estudio con los diferentes medio de cultivo y a diferentes días: A) 3 días en D/MEM; B) 3 días en M.O.; C) 3 días en M.O.+ASA; D) 7 días en D/MEM; E) 7 días en M.O.; F) 7 días en M.O.+ASA; G) 14 días en D/MEM; H) 14 días en M.O.; I) 14 días en M.O.+ASA. Tomadas a aumento 10X.	57
Figura 26: Fotografías al microscopio invertido de los constructos de PLA y MSCost a diferentes días de cultivo: A) 3 días; B) 7 días; C) 14 días .Tomadas a aumento 10X.	58
Figura 27: Fotografías tomadas con microscopia de fluorescencia del marcaje a Oc (FITC = verde) en los cultivos en el grupo MSCat en M.O. + ASA a diferentes aumentos: A) 40x; B) 63x; C) y D) 100x.	59
Figura 28: Fotografías tomadas con microscopia de fluorescencia del marcaje a Oc (FITC = verde) en los cultivos en el grupo MSCat + M.O. a diferentes aumentos: A) 40x; B) 63x; C) y D) 100x.	60
Figura 29: Fotografías tomadas con microscopia de fluorescencia del marcaje a Oc (FITC = verde) en los cultivos en el grupo del marcaje a Oc en los constructos: A) PLA y MSCat +M.O.; y B) PLA; C) MSCat M.O. + ASA. Aumento a 63X.	60
Figura 30: Fotografías tomadas con MEB de los constructos en D/MEM: A) distribución celular; B) morfología y migración al interior del poro.	61
Figura 31: Fotografías tomadas con MEB de los constructos en M.O. Las flechas en color verde muestran las células, los contorneados en lila muestran los poros, el contorneado azul muestra el conjunto celular semejando la matriz extracelular, 1 muestra el hilado del andamio; A) y B) se observa la distribución y migración de las células dentro de los poros; C) y D) las colonias formando una placa semejando una matriz extracelular distribuyéndose por el andamio.	62
Figura 32: Fotografías tomadas en microscopio óptico del andamio de PLA después de su implantación en la piel: A) 7 días, se observa el biomaterial e infiltrado inflamatorio; B) 14 días no se aprecia infiltrado inflamatorio y el biomaterial se encuentra parcialmente degradado. Tinción H&E y aumentos 4x, 10x y 40x.	63

14 ANEXOS

Elementos utilizados en el cuarto de cultivos.

Nombre	Marca
Antibiótico	Biowest®
BSA	Biowest®
Colagenase Type I	Gibco®
D/MEM High Glucose	Biowest®
FBS	Biowest®
HBSS	Biowest®
PBS	Sigma Aldrich®
Tripsina 0.25% EDTA	Biowest®

Reactivos utilizados.

Nombre	Marca
Azul de tripano	Sigma Aldrich®
Alcohol etílico	Hycl®
Ascorbato-2- fosfato	Sigma Aldrich®
DAPI	Sigma Aldrich®
Dexametasona	Sigma Aldrich®
DMSO	Sigma Aldrich®
Eosina	---
Goat anti-rabbit IgG-FITC (anti-rabiit)	Santa Cruz Biotechnology®
Hematoxilina	---
OsteocalcinFL-100 (Rabbit polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology®
Paraformaldehido	Sigma Aldrich®

Polyvinylpyrrolidone	Sigma Aldrich®
Tritón X-100	Sigma Aldrich®
β-glicerolfosfato	Sigma Aldrich®

Equipo utilizado.

Nombre	Marca
Bascula digital	KERN®
Campana de flujo laminar	NUAIRE®
Centrifuga	HERMLE®
Incubadora	NUAIRE®
Microscopio de fluorescencia	AXIO LAB de ZEISS®
Microscopio electrónico de barrido	AXIO LAB de ZEISS®
Microscopio invertido	AXIO LAB Vert.A1 de ZEISS®
Microscopio óptico	AXIO LAB de ZEISS®



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
COMISIÓN DE ÉTICA



Los Reyes Iztacala a 23/11/2017

Oficio: **CE/FESI/112017/1211**

DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA

Presente:

En atención a su solicitud de aval, por la Comisión de Ética de esta facultad, para su proyecto denominado **CITOCOMPATIBILIDAD DE CONSTRUCTO DE INGENIERÍA DE TEJIDOS ELABORADO CON PLA Y CÉLULAS TRONCALES.**, que va a someter a **CAAX tesis de Licenciatura.**

Esta comisión acordó la siguiente opinión técnica:

Avalado sin recomendaciones

Sin otro particular por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración y aprovechamos la oportunidad para enviarle un atento saludo y nuestro respeto académico.



Atentamente
M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido
Presidente





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Comisión de Bioseguridad



DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA
PRESENTE

Por este medio informo a Usted que su proyecto:

CITOCOMPATIBILIDAD DE CONSTRUCTO DE INGENIERÍA DE TEJIDOS ELABORADO
CON PLA Y CÉLULAS TRONCALES.

que será sometido a la convocatoria: TESIS de licenciatura de la alumna: Ana Laura Aceves
Jimenez.

Cumple con los requisitos establecidos por las leyes y normas en materia de Bioseguridad,
razón por la cual se avala para su desarrollo.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

Los Reyes Iztacala, a los 24 días del mes de enero del 2018

Biol. MUÑOZ LOPEZ JOSE LUIS
Presidente

