



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE HIDROGELES TERMOSENSIBLES
COMO ANDAMIO EN EL CULTIVO TRIDIMENSIONAL
DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES
DERIVADAS DEL ENDOMETRIO Y SU POTENCIAL DE
DIFERENCIACIÓN ÓSEA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ALAN EDUARDO VALENCIA AMAYA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ROBERTO SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

Ciudad Universitaria, CDMX 2019



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.

1. Datos del alumno
Valencia
Amaya
Alan Eduardo
25959134
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311044559

2. Datos del Tutor
Doctor en Ciencias
Roberto
Sánchez
Sánchez

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Yaaziel
Melgarejo
Ramírez

4. Datos del sinodal 2
Dr.
Jaime Iván
Velasco
Velásquez

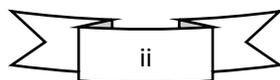
5. Datos del sinodal 3
Dra.
María Cristina
Velasquillo
Martínez

6. Datos del sinodal 4
Dra.
Gina
Prado
Prone

7. Datos del trabajo
Evaluación de hidrogeles termosensibles como andamio en el cultivo tridimensional de células troncales mesenquimales derivadas del endometrio y su potencial de diferenciación ósea. 84 p.
2019

Mientras que decían entre sí
no se puede hacer, se hizo.

Helen Keller



Agradecimientos

Al INR por facilitar el uso de las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del CENIAQ y la UITTCyMR de la torre de investigación.

A CONACYT por financiar el proyecto con el proyecto: "CONACYT Básica 287405"

A la doctora Cristina Velasquillo, por sus enseñanzas y confianza al ingresar a la materia de ingeniería de tejidos, al taller y al laboratorio. A mi tutor el doctor Roberto Sánchez por su apoyo durante la realización de este trabajo y la confianza para realizar otros en el laboratorio, al doctor Yaaziel Melgarejo por su apoyo y enseñanzas en el laboratorio, al maestro Valentín Martínez por su apoyo y consejos. Al resto del equipo del laboratorio de biotecnología y de la UITTCyMR por facilitar y apoyar con el uso de equipos e insumos de ambos laboratorios.

A mis sinodales, el doctor Iván Velasco y la maestra Gina Prado por sus aportaciones al trabajo en sus áreas correspondientes (células troncales y materiales)

Al doctor Mathieu Hautefeuille, por su apoyo y confianza para realizar el proyecto de servicio social en conjunto a la doctora Hortensia González en el taller de biofísica.

A la doctora Luisa Durán por su apoyo y consejos durante los últimos semestres de la carrera, así como su influencia en mi formación al dirigir el proyecto de servicio social y aconsejar sobre el proyecto de tesis.

A mis compañeros de laboratorio, M en C. Mario Pérez, M en C. Ana Camacho, Biol. Edson Aguillón, Biol. Karla Hernández, quienes además de compañeros se convirtieron maestros en el manejo de algunos equipos y la enseñanza de técnicas y procedimientos a Biol. Erick Martínez, Biol. Fernando Machado, Biol. Violeta Santiago, Biol. Ana Karen Olmos, que me ayudaron a mejorar el trabajo y a pasar momentos agradables mientras realizaba los experimentos.

A los que considero como mis mejores amigos a lo largo de la carrera y que han sido de gran apoyo durante estos últimos semestres Daniela Cortez y Santiago King.

A la UNAM por prepararme y darme grandes enseñanzas, académicas y personales, por arroparme desde la ENP 1 Gabino Barreda y culminar, por ahora, en la H Facultad de Ciencias. En ambas instituciones con grandes profesores y excelentes compañeros.

Finalmente, a mis padres y mi hermana, por todo el apoyo y amor que me han dado desde siempre, su confianza y paciencia a lo largo de toda la carrera.

Índice

I.	Resumen	1
II.	Abreviaturas	2
III.	Introducción	3
	A. Sistema esquelético	3
	B. Desarrollo del tejido óseo	3
	C. Osificación endocondral	4
	D. Osificación intramembranosa	5
	E. Histología del tejido óseo	6
	F. Estructura del hueso	10
	G. Enfermedades del sistema óseo	12
	H. Ingeniería de tejidos	14
	I. Células troncales	15
	J. Células troncales mesenquimales	17
	K. Andamios tridimensionales	21
IV.	Justificación	25
V.	Hipótesis	25
VI.	Objetivo	25
VII.	Metodología	26
VIII.	Resultados	40
IX.	Discusión	54
X.	Conclusión	61
XI.	Perspectivas	62
XII.	Anexos	63
XIII.	Referencias	66

I. Resumen

El sistema óseo es uno de los más grandes del cuerpo humano, provee soporte además de ser un gran almacén de calcio. Este sistema está compuesto por los huesos, los cuales pueden ser atacados por ciertas afecciones, como la osteogénesis imperfecta, osteoporosis y fracturas.

La ingeniería de tejidos (IT) es una disciplina que, tiene como objetivo regenerar o sustituir tejidos dañados, a partir del uso de andamios, moléculas (factores de crecimiento) y células. Es por ello que en los últimos años se ha aumentado su estudio y aplicación en tejidos como la piel, el cartílago y el tejido óseo. Los hidrogeles son uno de los materiales más utilizados como andamios en IT ya que estos permiten una fácil incorporación de moléculas como factores de crecimiento. Las células troncales mesenquimales (MSC) son un tipo celular que se caracteriza por presentar marcadores como CD73, CD90 y CD105 y por no presentar marcadores CCD34 y CD45. Las MSC tienen una gran capacidad de diferenciación en linajes óseo, cartilaginoso y adiposo, además de ser autorrenovables. Estas células se pueden encontrar en diversos tejidos, como la médula ósea, el tejido adiposo, el cordón umbilical y de más reciente descubrimiento, en el endometrio. Debido a sus características, las MSC son ampliamente investigadas y utilizadas en IT.

Los objetivos de este trabajo fueron aislar, por primera vez en el laboratorio de biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INRLGII), células troncales del endometrio (eMSC) a partir de sangre menstrual, diferenciarlas en un linaje de tejido óseo y finalmente evaluar la capacidad de un hidrogel de gelatina y uno de Pluronic F12 a diferentes concentraciones, para mantener viables a las eMCS.

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en cuanto a la obtención de eMSC, comprobado con la citometría de flujo, obteniendo marcadores CD73 y CD90 en rangos del 90 % de la población celular. Así mismo se observó que sí hay capacidad de diferenciación a un linaje óseo, ya que se observó en la presencia de RUNX2 en las células tratadas con medio de diferenciación. En cuanto a los hidrogeles se determinó que el hidrogel de gelatina al 35 % es la mejor opción para realizar un cultivo celular, esto debido a que su manipulación es más sencilla y además de permitir mayor viabilidad que el PF127.

Los resultados de este trabajo representan un antecedente para el desarrollo de futuras investigaciones dirigidas al tratamiento de afecciones en los huesos.

II. Abreviaturas

IT; Ingeniería de tejidos

MSC: Mesenchymal stem cell

Células troncales mesenquimales

eMSC: Endometrial mesenchymal stem cell

Células troncales mesenquimales del endometrio

PF127: Pluronic F 127

BMP: bone Morphogenetic Proteins

Proteínas morfogénicas de hueso

UCGT: Upper Critical Gelation Temperature

Temperatura de gelificación crítica superior

LCGT: Lower Critical Gelation Temperature

Temperatura de gelificación crítica inferior

PBS: Phosphate Buffered Saline

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

RUNX2: Runt-related transcription factor 2

OPN: osteopontina

BSP: sialoproteína ósea

OCN: osteocalcina

OSX: osterix

III. Introducción

Sistema esquelético

El sistema esquelético está conformado por 206 huesos, estos varían en tamaño, forma y función; dependiendo de la forma es cómo se clasifican. La función principal del sistema esquelético es la de soporte y movilidad. Sin embargo, también cumple una función de protección a otros órganos y sistemas, así mismo, al estar formado principalmente por un tejido cuya matriz extracelular está osificada, tiene una función de almacenamiento de fosfato y calcio (Fortoul, 2013; Ross & Pawlina, 2013; Tortora, Derrickson, 2013).

Es importante diferenciar al sistema esquelético del hueso y el tejido óseo. El primero se refiere a el conjunto de huesos que conforman el esqueleto de los vertebrados. Al mencionar hueso, nos referimos al conjunto de tejidos que forman un hueso. Finalmente, el tejido óseo es aquel que está formado por las células de linaje osteogénico y una matriz extracelular mineralizada (Hall, 2015).

Desarrollo del tejido óseo.

Los huesos son generados a partir de tres distintos linajes, durante el desarrollo embrionario. Las somitas generan el esqueleto axial (vértebras, discos vertebrales y costillas), el mesodermo de la placa lateral genera el esqueleto de las extremidades (brazos y piernas) y la cresta neural craneal da lugar al arco branquial, huesos y cartílago craneofaciales (Karaplis, 2008; Tortora, Derrickson, 2013).

Sin importar la función, forma, tamaño, estructura, etc, todos los huesos se forman únicamente a partir de dos procesos; la osificación endocondral y la formación intramembranosa (Provot, et al, 2013). Ambos procesos implican la transformación de un tejido mesenquimatoso preexistente en un tejido óseo.

Los huesos del cráneo tienen un origen doble, ya que en ellos participan tanto células de origen mesenquimal, es decir que provienen del mesodermo, como células del ectodermo, además en su mayoría son generados a partir de la

osificación intramembranosa a excepción del hueso occipital, el cual sufre el proceso de osificación endocondral (Percival & Richtsmeier, 2013).

Se puede decir que en el desarrollo óseo endocondral existen procesos clave, los cuales son la formación de condrocitos, la maduración de estos y la diferenciación de osteoblastos. (Karaplis, 2008; Long & Ornitz, 2013).

Lo que está bien establecido para ambos tipos de osificación, es el hecho que RUNX2 tiene un papel crucial en el desarrollo de los osteoblastos (Aubin, 2008).

Osificación endocondral.

En ambos tipos de osificación hay un pre-proceso de condensación de células troncales mesenquimales, posterior a este proceso podemos dividir a la osificación endocondral en cinco etapas:

- a) Las células troncales mesenquimales se comprometen a un linaje condrogénico, comienzan a expresar Pax1.
- b) Las células empiezan a diferenciarse a condrocitos y comienza a expresar SOX9.
- c) Los condrocitos proliferan rápidamente y forman el molde del hueso. Se comienza a secretar una matriz característica del cartílago.
- d) Disminuye la proliferación de condrocitos y estos aumentan su tamaño, convirtiéndose en condrocitos hipertróficos, secretan colágena tipo X y fibronectina.
- e) La matriz cartilaginosa se comienza a irrigar, es decir se forman vasos sanguíneos y los condrocitos entran en apoptosis.
- f) Finalmente, células troncales que permanecen en la matriz gelatinosa, se comienzan a diferenciarse en osteoblastos, los cuales secretan la matriz ósea y promueven la mineralización, degradando la matriz que secretaron los condrocitos (Gilbert, 2000; Provot, et al, 2013). En la figura 1 se muestra de manera esquemática la manera en la cual se da la osteogénesis endocondral.

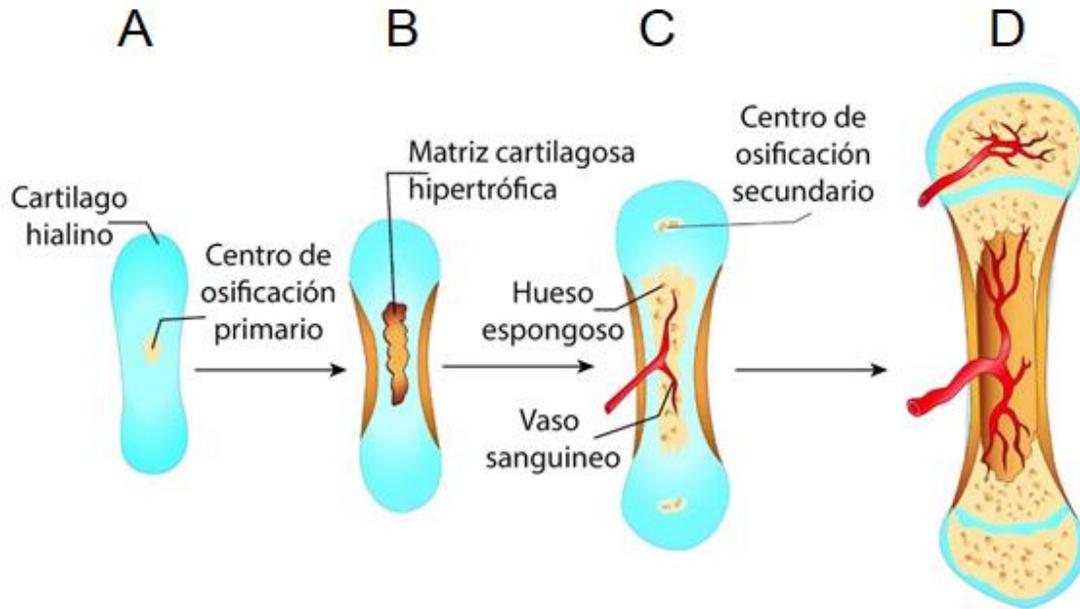


Figura 1. Fases de la osificación endocondral. A) Se observa la condensación de las células troncales mesenquimales B) Comienza la diferenciación condrogénica. Una vez formado el andamio de cartílago, los condrocitos sufren hipertrofia y comienza la osificación C) Los vasos sanguíneos se internan en el andamio junto a precursores osteoblásticos y se forman los centros osteogénicos secundarios D) Sigue la actividad osteogénica y de angiogénesis. Modificado de Provot, et al, 2013

Osificación intramembranosa.

El proceso de osificación intramembranosa se caracteriza porque las células mesenquimales se diferencian directamente en células óseas (osteoblastos), sin pasar por etapas cartilaginosas. Este es el proceso por el cual se desarrollan los huesos planos y los huesos craneales y craneofaciales. (Karaplis, 2008; Provot, et al, 2013).

Los mecanismos por los cuales ocurre esta diferenciación directa, aún no están bien estudiados, sin embargo, se piensa que está relacionada a la actividad de RUNX2, el cual es activado por las Bone Morphogenic Proteins (BMPs), probablemente por BMP2, BMP4 y BMP7 (Gilbert, 2000; Percival & Richtsmeier, 2013; Provot, et al, 2013). Así mismo se ha observado que también es necesaria la presencia del factor de transcripción Osterix (OSX). Ambos factores son críticos para la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos. Las células ya desarrolladas

(precursoras de osteoblastos) comienzan a producir, en particular colágena tipo I junto con una variedad de proteínas de la matriz extracelular no colágenas que se depositan junto con una fase mineral inorgánica (Percival & Richtsmeier, 2013; Provot, et al, 2013).

Histología del tejido óseo.

El principal tejido calcificado de los vertebrados es el hueso, éste se desarrolla por el proceso de osificación dando origen a un tejido conjuntivo especializado (Hollinger, et al, 2004; Ross & Pawlina, 2013). Al igual que otros tejidos conjuntivos, el tejido óseo está compuesto por células y matriz extracelular. Sin embargo, lo característico del tejido óseo es su matriz extracelular mineralizada, la cual está dada por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita (Ross & Pawlina, 2013). Las células del hueso incluyen a los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Aubin, 2008; Karaplis, 2008). Los osteoblastos son células cuboidales, encargadas de desarrollar la matriz osificada de los huesos, mientras los osteoclastos son alargados, multinucleados y son responsables de la degradación de la matriz. Los osteocitos son el resultado de la diferenciación de los osteoblastos y quedan embebidos en la matriz, además de ser responsables del mantenimiento de la misma. Las estructuras circulares formadas por los osteocitos se denominan osteonas (Provot, et al, 2013 ; Hall, 2015). Existen dos fases temporales en el tejido óseo a las cuales se les denomina hueso inmaduro y hueso maduro. Estas fases tienen diferencia principalmente en la composición de la matriz extracelular.

Hueso inmaduro.

El hueso inmaduro, a diferencia del hueso maduro, tiene una mayor cantidad de sustancia fundamental (matriz de colágena I y otras proteínas, no mineralizada) además de tener una mayor proporción de células que las que se observan en el hueso maduro. Este tipo de hueso también se denomina trabecular y se presenta durante la osteogénesis y la reparación de fracturas (Fortoul, 2013; Kroman & Symes, 2013; Ross & Pawlina, 2013; Tortora, Derrickson, 2013).

Hueso maduro.

El hueso maduro por otra parte, al ser el que está totalmente desarrollado, está completamente mineralizado y la cantidad de células y sustancia fundamental es menor, además de tener una organización laminar. El hueso maduro se clasifica en hueso compacto y hueso esponjoso, y se denominan así dependiendo de su estructura histológica (Fortoul, 2013; Ross & Pawlina, 2013; Tortora, Derrickson, 2013).

Los huesos están revestidos en su parte exterior por periostio, el cual es un tejido conjuntivo denso fibroso y donde se encuentran las células osteoprogenitoras que originan a los osteoblastos. El periostio no está presente en las zonas o regiones de articulación. Así mismo, la capa que recubre el interior, es decir donde se encuentra la cavidad que contiene la médula ósea, se denomina endostio y solo está compuesta por una capa de células osteogénicas (Ross & Pawlina, 2013).

Composición de la matriz extracelular.

La matriz extracelular ósea está compuesta por proteínas y minerales (hidroxiapatita). A la porción de matriz no mineralizada se le denomina sustancia fundamental (Ross & Pawlina, 2013). La colágena es la proteína más abundante, siendo la colágena tipo I, la que se encuentra en mayor proporción, aunque también se han encontrado pequeñas cantidades de colágena tipo III y tipo V. El resto de proteínas presentes en la matriz del hueso, a pesar de estar en una cantidad mínima, son muy importantes para la organización y la osificación de la matriz (Hollinger, et al, 2004). Estas proteínas se clasifican en los cuatro siguientes grupos:

- a) Macromoléculas de proteoglicano, los cuales están formados por una proteína central con cadenas laterales de glucosaminoglicanos como hialuronato, condroitin sulfato y queratán sulfato. Estos le confieren al tejido óseo, resistencia a la compresión (Hollinger, et al, 2004; Hall, 2015).
- b) Glucoproteínas multiadhesivas, las cuales permiten la adhesión entre las células óseas y las fibras de colágena, como la osteonectina, la osteopontina

y las sialoproteínas I y II (Hollinger et al, 2004; Hall, 2015).

- c) Proteínas dependientes de vitamina K, como la osteocalcina, que permite el reclutamiento de calcio, la proteína S que contribuye en la eliminación de las células apoptóticas (Hollinger, et al, 2004; Hall, 2015).
- d) Factores de crecimiento y citocinas, que son factores reguladores, entre las más importantes se encuentran las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), Factor de necrosis tumoral alfa (TNFa), factor de crecimiento transformante beta (TGFb) y las interleucinas 1 y 6 (IL1 e IL6) (Hollinger, et al, 2004; Hall, 2015).

Células óseas.

En el tejido óseo podemos encontrar una variedad de células características del mismo. Como se mencionó anteriormente, los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos son los principales tipos celulares que encontramos en el tejido óseo (Aubin, 2008; Fortoul, 2013; Gilbert, 2000; Hall, 2015; Ross & Pawlina, 2013; Provot, et al, 2013; Tortora, Derrickson, 2013)

Osteoblastos

Los osteoblastos son las células que, generan la matriz extracelular del tejido óseo, secretando principalmente colágena tipo I, que como se describió en la sección de matriz extracelular, es el principal componente no mineralizado de ésta. Sin embargo, no es la única proteína que secretan, también hay en menor cantidad, secreción de osteopontina, osteocalcina y sialoproteínas óseas. Al ser células secretoras, las caracteriza un aparato de Golgi prominente y posee un núcleo grande. (Gilbert, 2000; Provot, et al, 2013). Los osteoblastos se originan a partir de células troncales mesenquimales multipotentes. La vía de diferenciación de las células troncales está regulada por factores de transcripción específicos de cada tejido. RUNX2 es un factor de transcripción esencial en la diferenciación de las células troncales en osteoblastos y la maduración de los condrocitos, en la diferenciación ósea también están involucrados el factor de transcripción osterix (OSX) y la vía de señalización canónica de Wnt (Bruderer, et al, 2014; Komori, 2018;

Xu, et al, 2015). Durante el proceso de diferenciación de osteoblastos, RUNX2 participa en la expresión de genes de matriz extracelular ósea como Col1, osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP) y osteocalcina (OCN) y mantiene la expresión de OPN y BSP.

Una vez iniciada la diferenciación de las células troncales en linaje óseo, el proceso, lo podemos dividir en tres estados de desarrollo de diferenciación: proliferación, maduración de la matriz extracelular y mineralización. Estos estados han sido estudiados *in vitro* teniendo un comportamiento como el presentado en la figura 2 (Hollinger, et al, 2004).

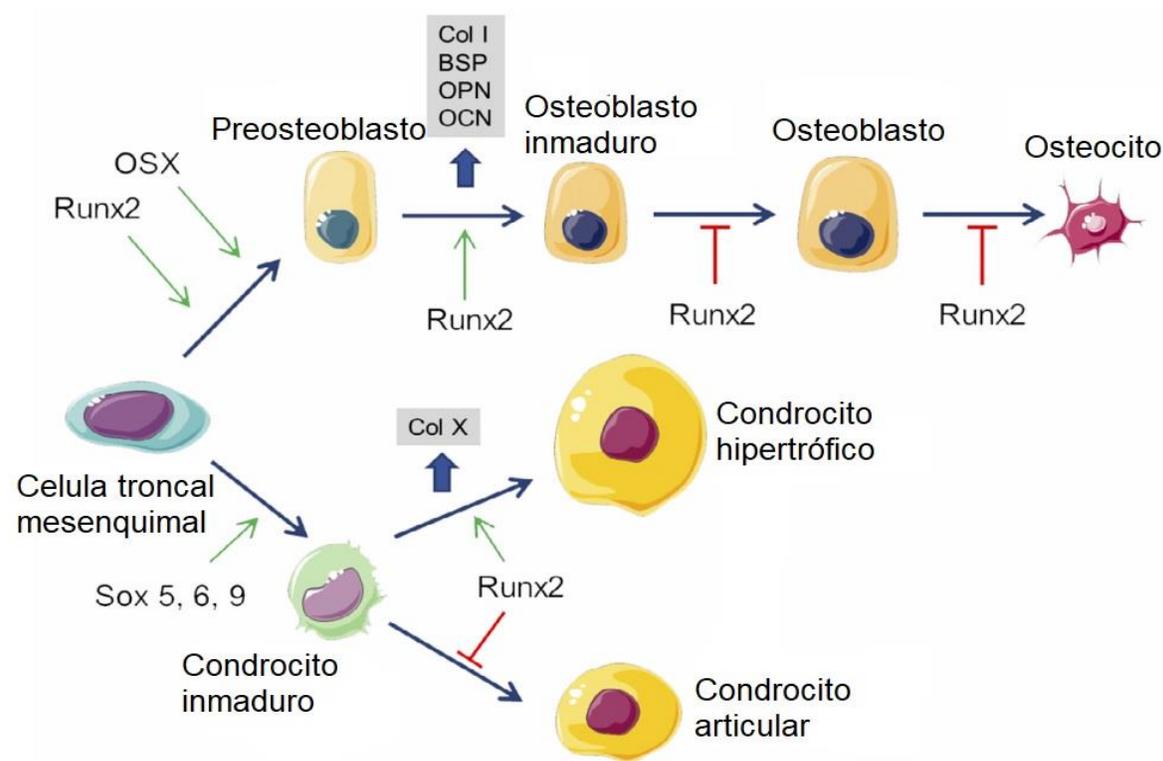


Figura 2. Participación de RUNX2 en la diferenciación de una célula troncal mesenquimal a un linaje óseo (osteocito). Las líneas rojas indican una regulación negativa, es decir, que la acción del factor de transcripción es evitar que se siga la diferenciación. Las flechas verdes indican las fases en las cuales los factores de transcripción ejercen una regulación positiva, es decir, que promueve la diferenciación celular. En fondo gris se observan genes que son activados a causa de la actividad de RUNX2. Tomado y modificado de Bruder et al, 2014.

El último paso de la diferenciación de las células troncales a células del linaje óseo es la diferenciación de los osteoblastos a osteocitos. En la figura 3 podemos observar el proceso de maduración de los osteoblastos. Los osteocitos son las células que le dan mantenimiento al tejido óseo, y están en constante comunicación.

Osteoclastos

A diferencia de los osteoblastos que se derivan de células troncales mesenquimales, los osteoclastos se derivan de células hematopoyéticas. Su función es degradar la matriz extracelular del tejido óseo que generan los osteoblastos, remodelando los huesos (Gilbert, 2000; Provot, et al, 2013).

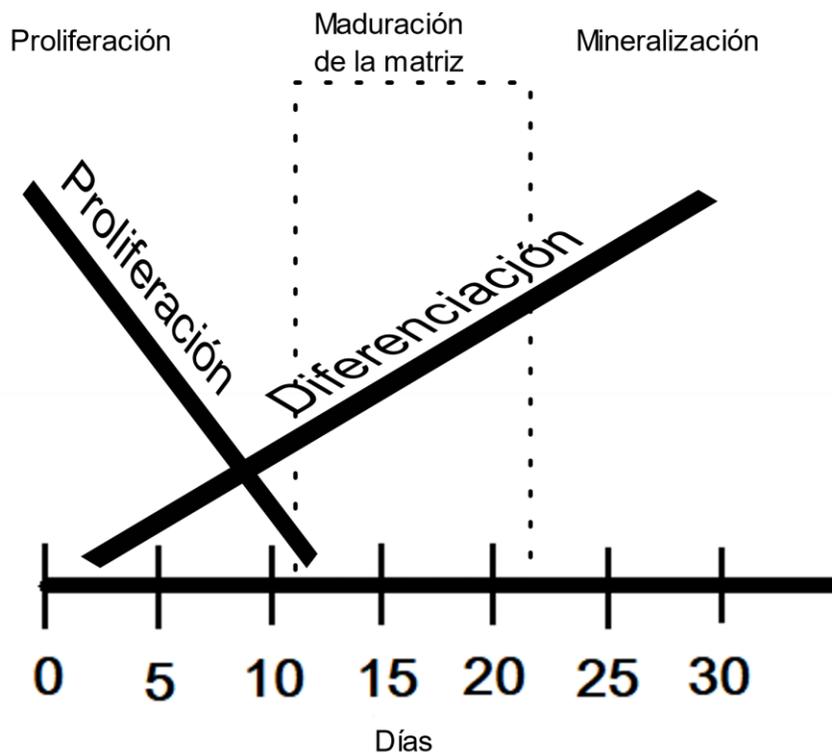


Figura 3. Tiempo de diferenciación óseas. Durante los primeros 10 días las células proliferan, del día 11 al día 21 se secreta y madura la matriz de colágena, por lo que la diferenciación de células troncales a osteoblastos se da en este tiempo. Finalmente, del día 22 al día 30 se empieza a mineralizar la matriz, por lo que también hay presencia de osteocitos. Tomado y modificado de Hollinger, Einhorn, Doll, & Sfeir, 2004.

Estructura del hueso.

El hueso está conformado por tejido óseo, tejido hematopoyético, tejido adiposo, vasos sanguíneos y nervios. Si el hueso se ubica en una articulación, también está asociado a cartílago hialino o articular. Existen dos tipos de estructuras en el tejido óseo de los vertebrados, el hueso compacto y hueso esponjoso (Hall, 2015).

Hueso esponjoso

También conocido como hueso trabecular, ya que está conformado por trabéculas o espículas, en cuanto a la composición celular y de matriz extracelular, es similar a la del hueso compacto, sin embargo, el hueso esponjoso no se organiza en forma laminar (Hall, 2015; Tortora, Derrickson, 2013).

Hueso compacto

El hueso compacto, se caracteriza por estar organizado en osteonas o sistemas de Havers, los cuales son estructuras redondas, que tienen un canal central llamado conducto de Havers, en el cual hay irrigación e inervación, estos conductos están rodeados en primera instancia por endostio, y finalmente por círculos concéntricos de tejido óseo. Los osteocitos que conforman el hueso compacto están en comunicación por medio de los canaliculos óseos (Tortora, Derrickson, 2013). Las osteonas se comunican entre sí, así como con el periostio y la médula ósea a través del conducto de Volkmann (Tortora, Derrickson, 2013). Como se mencionó anteriormente, los huesos se pueden clasificar según su forma, esta clasificación consiste en cuatro grupos:

- a) Huesos largos: se componen de tres estructuras, una diáfisis y dos epífisis, la primera es notablemente más larga que las otras dos. Generalmente las epífisis están recubiertas por cartílago hialino. La región de unión entre la diáfisis y las epífisis se denomina metáfisis (Tortora, Derrickson, 2013).

Una diferencia más entre la diáfisis y las epífisis es la conformación de tejido

óseo que hay en ellas, mientras en la diáfisis predomina el tejido óseo compacto, las epífisis están compuestas principalmente de tejido óseo esponjoso (Tortora, Derrickson, 2013).

b) Huesos cortos: Tienen las tres dimensiones similares en tamaño en cuanto lo demás son similares a los huesos largos, a excepción de estar formados por una delgada capa exterior de tejido óseo compacto y estar “relleno” de tejido óseo esponjoso (Tortora, Derrickson, 2013).

c) Huesos planos: son delgados y anchos. Están formados por dos capas de tejido óseo compacto y una capa interna entre esas dos, de tejido óseo esponjoso (Tortora, Derrickson, 2013).

d) Huesos irregulares: Pueden tener formas complejas o bien espacios aéreos o senos, lo que no permite clasificarlos en ninguno de los grupos anteriores (Tortora, Derrickson, 2013).

Enfermedades del sistema óseo.

Al igual que el resto de los tejidos y órganos, los huesos están expuestos a sufrir de enfermedades, lesiones y a degradarse con el tiempo, estas afecciones pueden ser por infecciones, defectos genéticos o traumas.

Osteogénesis imperfecta.

La osteogénesis imperfecta es un desorden genético del tejido conectivo, debido a mutaciones de uno de los dos genes (COL1A1 y COL1A2) que codifican la síntesis de colágena tipo I (Cabrera, et al, 2013; Ruck, et al, 2011), por lo cual no hay una buena generación de la matriz extracelular, provocando que los huesos sean frágiles.

Las manifestaciones clínicas de la osteogénesis imperfecta varían desde individuos

relativamente asintomáticos con mayor predisposición a fracturas, talla normal en los que la esperanza de vida no se ve afectada, hasta individuos con una alta letalidad perinatal con deformidades esqueléticas severas, incapacidad motora y talla extremadamente baja (Cabrera et al., 2013; Ruck et al., 2011). En México se reporta una incidencia de 1 a 20,000 infantes con osteogénesis imperfecta tipo II. Presentan fragilidad ósea extrema, culminando con la muerte perinatal o durante la lactancia; los huesos largos están muy fragmentados, y la osificación craneana se retrasa de manera intensa (Cabrera et al., 2013; Ruck et al., 2011).

Osteoporosis.

La osteoporosis, es un trastorno caracterizado por resistencia ósea disminuida, es prevalente entre las mujeres posmenopáusicas, pero también afecta a varones y a mujeres con trastornos subyacentes o factores mayores de riesgo relacionados con desmineralización ósea (Lindsay y Cosman, 2012). La osteoporosis se define como reducción de la resistencia ósea que incrementa el riesgo de fracturas. La pérdida de tejido óseo se relaciona con deterioro de la microarquitectura esquelética. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define operacionalmente a la osteoporosis como una densidad ósea que cae 2.5 desviaciones estándar, por debajo del promedio de los adultos jóvenes sanos del mismo género, también conocida como una calificación T de -2.5 . Las mujeres posmenopáusicas que inciden en el extremo inferior del espectro joven normal (calificación T <-1.0) son aquellas que tienen una densidad ósea reducida y mayor riesgo de padecer osteoporosis. Este grupo con densidad ósea reducida padece más de 50% de las fracturas en las mujeres posmenopáusicas, incluidas las fracturas de cadera (Lindsay, 2012). Representa la enfermedad metabólica ósea más frecuente y constituye un problema de salud pública en el mundo (Diagnóstico y Tratamiento de Osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. México: Secretaría de Salud; 2013). Su importancia clínica radica en las fracturas y consecuencias médicas, sociales y económicas asociadas que ocasionan un gran impacto en la calidad de vida e independencia funcional de hombres y mujeres (National Osteoporosis Foundation 2008; SING 2003). Su prevalencia en México en mujeres y hombres mayores de 50 años de edad es de

17 y 9% en columna lumbar, respectivamente, así como de 16 y 6% en cadera, respectivamente. Se ha estimado que el riesgo de fractura de cadera a lo largo de la vida es de 8.5% en mujeres y 3.8% en hombres en el país (Reza-Albarrán, 2016).

Fracturas.

Las fracturas se pueden producir desde el nacimiento hasta la vejez y presentan distintas características, localizaciones y grados de severidad; por su impacto constituyen uno de los sucesos patológicos más importantes en la vida del ser humano. En el origen de una fractura intervienen tanto el traumatismo como las características del hueso (García et al. 2013).

En el año 2006 se reportan costos directos de más de 97 millones de dólares por fracturas de cadera, la estimación para el año 2025 varía de 213 millones a más de 466 millones de dólares y para el año 2050 se estiman costos de 555 a 4088 millones de dólares (Diagnóstico y Tratamiento de Osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. México: Secretaría de Salud; 2013). Actualmente, las fracturas, se consideran un problema de salud pública en México debido a los gastos hospitalarios e incapacidad laboral que generan (Lovato-Salas, et al, 2015).

Ingeniería de tejidos.

Las enfermedades, lesiones y degradación de los tejidos en el cuerpo humano, requieren de tratamientos para facilitar su reparación, reemplazo o regeneración.

Existen tratamientos como autoinjerto o aloinjerto, sin embargo, existen grandes problemas con ambas técnicas. La recolección de autoinjertos es costosa, dolorosa, tiene limitaciones anatómicas y está asociada con la morbilidad del sitio donante debido a infección y hematoma. Del mismo modo, los aloinjertos tienen el potencial de activar el sistema inmune del paciente y causar rechazo, así como la posibilidad de introducir una infección o enfermedad del donante al paciente. (Atala, 2004)

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario en donde se aplican conjuntamente los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida, en busca

del desarrollo de sustitutos biológicos capaces de preservar, mejorar, reparar y regenerar las funciones de un tejido u órgano (Langer & Vacanti, 1993). Por lo cual, surge como una alternativa a los métodos tradicionales como los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos.

Así mismo, la ingeniería de tejidos genera los sustitutos biológicos a partir de tres pilares fundamentales, los factores de crecimiento o moléculas de inducción y andamios tridimensionales (Langer & Vacanti, 1993).

La elección de la fuente celular correcta es un punto crucial para la ingeniería de tejidos. Las células utilizadas pueden ser de varios tipos:

- Autólogas: son células tomadas del mismo individuo en el que se realizará la implantación. Este tipo de células reduce drásticamente los problemas de rechazo y transmisión de enfermedades.
- Alogénicas: Son procedentes de un donante de la misma especie.
- Xenogénicas: Estas células se obtienen de un donante de otra especie.

Así mismo se pueden utilizar distintas fuentes de tejidos dependiendo de la zona del cuerpo que se desee reparar, sin embargo, en las últimas décadas el uso de células troncales como una opción terapéutica ha sido muy estudiada gracias a su capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares.

Además de las células, el andamio es muy importante, ya que debe imitar la matriz en que se encuentran las células en el tejido a reparar, y tener propiedades físicas y químicas que contribuyan a la restauración más pronta del tejido. Por lo tanto, los materiales, estructura y forma que tomaran los andamios se eligen según la aplicación específica.

Células troncales.

Las células troncales son un grupo específico de células indiferenciadas con un alto potencial proliferativo y que presentan dos características fundamentales: son autorrenovables y tienen la capacidad de originar varios linajes celulares distintos.

Estas características se encuentran representadas en la figura 4 (Masuda et al., 2010; Vassena et al., 2015).

Las células troncales (figura 4) se pueden clasificar de varias maneras, una de ellas es de acuerdo a su capacidad de diferenciación o potencialidad, dentro de las cuales encontramos: células totipotentes que tienen el potencial de dar origen a un organismo completo, pluripotentes que se pueden diferenciar en células de cualquiera de las tres capas germinales y multipotentes las cuales solo se pueden diferenciar en varios linajes celulares, pero no a las tres capas germinales (Figueira, et al, 2011; Vassena et al., 2015).

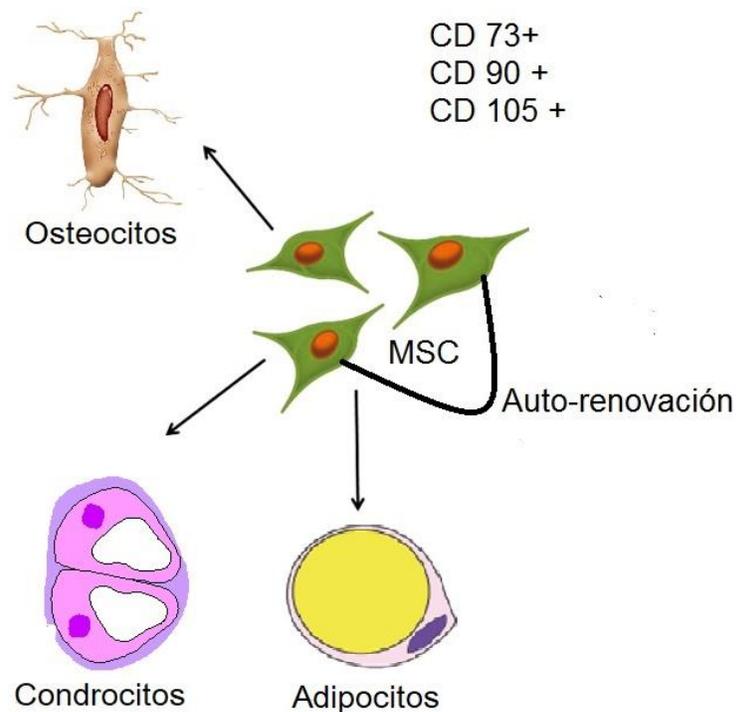


Figura 4. Las MSC y su diferenciación. Se representa las características principales de las células troncales mesenquimales, como lo son la auto renovación, diferenciación (adipocitos, condrocitos y osteocitos) y la presencia de marcadores CD73, CD90 y CD105

Dependiendo de su origen las células troncales se clasifican según la etapa de desarrollo en:

Células troncales embrionarias.

Evans y Kaufman en 1981 a partir de un blastocisto de ratón aislaron por primera vez células troncales embrionarias, se llamaron así ya que tienen ciertas características, siendo la más importante, la pluripotencialidad de estas células, es decir, se pueden diferenciar en cualquiera de los tipos celulares de cualquiera de las tres líneas germinales.

Células troncales pluripotentes inducidas (IPS).

Fueron descritas por Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka en 2006, estas células se derivan a partir de células totalmente diferenciadas como los fibroblastos, los cuales cultivados en condiciones de células troncales e introduciendo a ellas los factores Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, se reprograman y obtienen características de células troncales pluripotentes.

Células troncales adultas.

Estas células se encuentran presentes en varios de los tejidos adultos, se caracterizan por ser autorrenovables, tener una alta tasa de proliferación, y ser multipotentes, por lo que se pueden diferenciar a uno o más linajes celulares.

Existen distintos tipos de células troncales adultas que constantemente están formando tejido nuevo en el organismo como las células troncales hematopoyéticas, las células troncales neurales y las células troncales mesenquimales. Estas últimas tienen mucha relevancia, ya que se pueden obtener de distintas fuentes y se logran diferenciar a varios linajes, lo cual implica la posibilidad de generar terapia celular de forma autóloga.

Células troncales mesenquimales.

El interés por el estudio de las células troncales mesenquimales ha incrementado en los últimos años, especialmente por su potencial en la medicina regenerativa, especialmente en la terapia celular y en la ingeniería de tejidos. Las células

troncales mesenquimales (MSC) pertenecen al grupo selecto de células troncales, las cuales son capaces de renovarse a través de la división celular y pueden diferenciarse en células de múltiples linajes. Las MSC humanas (hMSC) son células troncales multipotentes no hematopoyéticas con la capacidad de diferenciarse en linaje mesodérmico, como osteocitos, adipocitos y condrocitos, así como linajes ectodérmicos (precursores neuronales) y endodérmicos (hepatocitos). Las MSC expresan marcadores de superficie celular como clúster de diferenciación CD73, CD90, CD105 y carecen de la expresión de CD14, CD34, CD45 y HLA-DR (antígeno leucocitario humano). Las hMSC por primera vez se aislaron de la médula ósea y hasta ahora se han aislado de diversos tejidos, incluidos el tejido adiposo, el líquido amniótico, el endometrio, los tejidos dentales, el cordón umbilical, entre otros (Dominici et al., 2006; Flores-Figueroa, et al, 2006; Ghobadi, et al, 2015; Ullah, et al, 2015).

Células troncales mesenquimales derivadas del endometrio

Antes de hablar sobre las células troncales derivadas del endometrio, es importante saber qué es el endometrio y dónde se encuentra. El endometrio es la mucosa más externa que recubre al útero, se encuentra sobre el miometrio, que es la capa muscular. El endometrio se compone principalmente de glándulas, tejido conjuntivo y vasos sanguíneos, la aparente función del endometrio es la implantación del cigoto (Tortora, Derrickson, 2013).

La primera vez que se observaron las células troncales derivadas del endometrio (eMSC) fue en 2004 con los experimentos de Chan y colaboradores, quienes descubrieron que en los cultivos de endometrio de rata había una población celular adherente y que había presencia de unidades formadoras de colonias, lo que es una característica de las células troncales (autórenovación). Estas primeras células se obtuvieron directamente del endometrio, es decir que se realizó una cirugía a las ratas para poder llegar al endometrio.

El descubrimiento de células troncales mesenquimales en el endometrio, ha generado una gran investigación en torno a la naturaleza de estas células, así como

en sus posibles aplicaciones (Gargett, et al, 2016; Verdi, et al, 2014). Se ha reportado en varios trabajos, la presencia de células troncales derivadas del endometrio, en muestras de sangre menstrual de donde han sido aisladas (Meng et al., 2007; Musina, et al, 2008; Cervelló et al, 2010; Allickson, et al, 2011; De Carvalho Rodrigues et al., 2012; Rossignoli et al., 2013; Du, et al, 2016).

Las eMSC (figura 5) cultivadas expresan marcadores típicos utilizados para las células troncales mesenquimales; CD9, CD10, CD13, CD14, CD29, CD31, CD44, CD73, CD90, CD105, CD117, CD133, CD146 además de otros marcadores como Oct-4 y SOX2, pero no STRO-1, SSEA- 4, Nanog, CD14, CD31 (endotelial), CD34 CD38, CD 45, CD 133 (Meng et al., 2007; Schwab & Gargett, 2007; Gargett, et al 2016; Verdi, et al, 2014; Ghobadi, et al, 2015; Rodrigues et al., 2016; Mehrabani et al, 2016; Du, et al, 2016; Faramarzi et al, 2016;). Además, las eMSC podría ser purificadas gracias a su co-expresión de dos marcadores perivasculares CD140b y CD146. (Darzi, 2016; Masuda, et al, 2012 ; Verdi, et al, 2014).

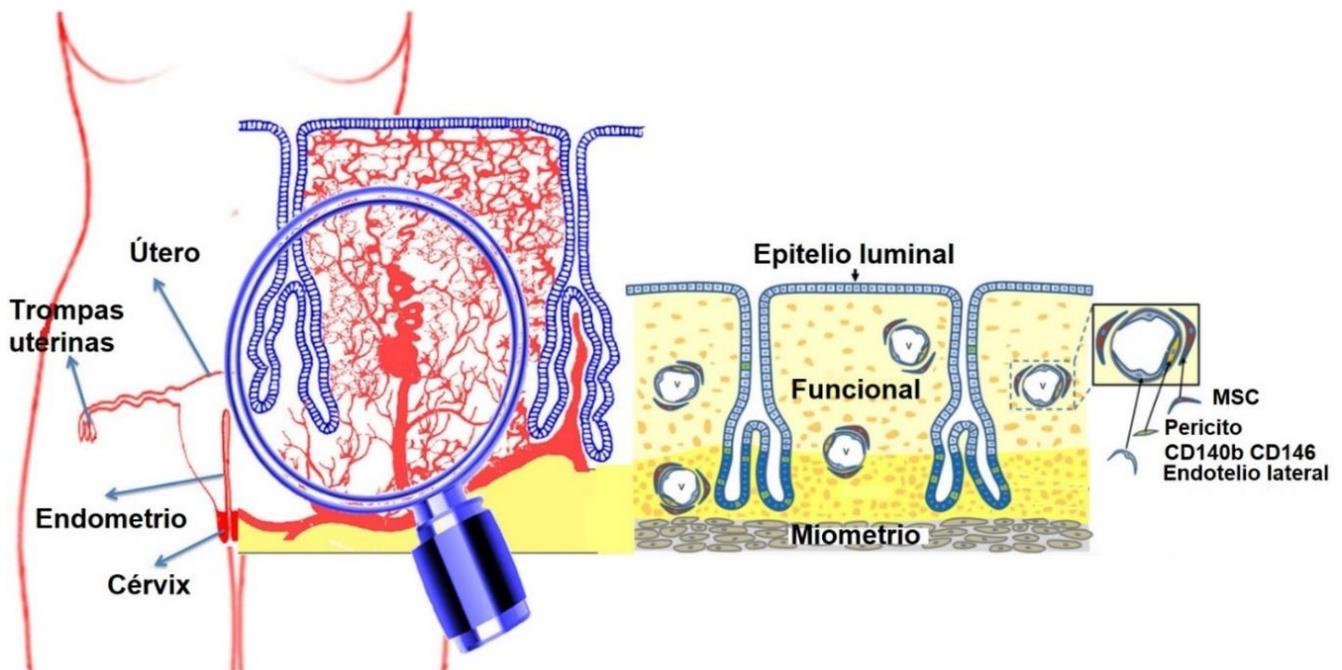


Figura 5. ubicación de las células troncales mesenquimales en el endometrio (eMSC). Las eMSC se encuentran en la periferia de los vasos sanguíneos del endometrio, asociadas a pericitos, que es la capa más externa del útero. Tomado y modificado de Gargett, et al, 2016; Verdi, et al, 2014

Las células con un fenotipo de células troncales hematopoyéticas (CD34 + CD45 +) que expresan conjuntamente CD7 y CD56 se han identificado en suspensiones de células endometriales humanas y pueden ser progenitores linfoides (Verdi, et al, 2014).

En otros estudios las eMSC obtenidas a partir de la sangre menstrual, se han logrado diferenciar en cultivo, a varios linajes celulares, como lo son el linaje neuronal, hepático, pancreático, pulmonar, miocardio (Zhang et al., 2013), adipogénico (Khanmohammadi et al., 2014) condrogénico (Kazemnejad et al., 2012; Khanmohammadi et al., 2012) y a linaje osteogénico (Darzi et al., 2012; Karadas, et al, 2014; Santos et al., 2015).

Incluso Lai y colaboradores reportaron en 2016 la inducción de las células troncales mesenquimales derivadas del endometrio en células parecidas a ovocitos, mostrando marcadores de células germinales. Así mismo se han utilizado como sustrato para el cultivo de células troncales embrionarias (Silva Dos Santos et al., 2014).

El endometrio es una excelente fuente de células con las cuales se podría realizar terapia celular, ya que se obtienen sin realizar procedimientos invasivos, siendo además que su recolección puede darse cada vez que una mujer tiene su periodo menstrual, aunado a que hoy en día el uso de copas menstruales cada vez es más común lo que facilita la recolección para su posterior aislamiento (Khoury, et al, 2014; Alcayaga-Miranda et al., 2015; Allickson, et al, 2011; Anisimova, et al, 2013; Chen, et al, 2015).

Uno de los linajes celulares descritos a los que se pueden diferenciar estas células es el linaje óseo, por lo que podría resultar benéfico su aislamiento y diferenciación a osteocitos con el objetivo de generar terapias para distintas lesiones óseas en un futuro. La diferenciación de las células troncales está dada por: la interacción de histonas, vías de señalización, estimulación de carga mecánica, la composición del medio de cultivo, las características de los andamios donde se siembran, características que ayudan a tener un mayor porcentaje de diferenciación y

viabilidad (Haider, et al., 2014; Maji, et al., 2016; Wang et al., 2016).

Se ha especificado la importancia de ciertos factores de crecimiento para la diferenciación de células troncales a células óseas, como la BMP2, el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), la colágena y la insulina (Abarategi et al., 2012; Keothongkham et al., 2017). A continuación, en la tabla 1 se muestran algunos protocolos utilizados para la diferenciación de eMSC obtenidas a partir de sangre menstrual.

Autor	Reactivos.	Días de cultivo
(Rossignoli et al., 2013)	(DMEM, 10nM de dexametasona, 10 mM de b-glicerol fosfato, 0.1 mM de ácido ascórbico, 10% de FBS, 1% de glutamina, 1% de penicilina, estreptomycin, 100ng/ml BMP-2	14
(Li, Chow, & Chu, 2017)	DMEM, 10% FBS, 1% de penicilina, estreptomycin, 200 mM de ácido ascórbico 0.1 mM dexametasona y 10 mM b-glicerol fosfato + estructuras micro estructuradas de gelatina	14
(Darzi et al., 2012)	DMEM-F12 0.1mM dexametasona, 10mM deb-glicerol fosfato y 50 mM ácido ascórbico	14
(Karadas, et al, 2014)	DMEM, 10 nM dexametasona, 50 mg/ml ácido ascórbico, 10 mM b-glicerol fosfato, 10% FBS y 100 units/mL peniciliina-100 mg/mL estreptomycin)	21

Tabla 1. Protocolos de diferenciación ósea. Lista de distintos trabajos en los cuales se realizaron diferenciaciones de células troncales mesenquimales a células óseas.

Andamios tridimensionales.

En ingeniería de tejidos o incluso en cultivos de celulares tridimensionales, la interacción entre las células y el material sobre el cual están cultivadas las células

(andamio) está controlada principalmente por las propiedades físico-químicas del material. Con el fin de inducir la adhesión, la proliferación y la activación celular, es necesario que el material cumpla con ciertos requisitos tales como biocompatibilidad intrínseca, biodegradación, química apropiada para inducir la producción molecular de las células, propiedades mecánicas adecuadas para mantener la estabilidad estructural del tejido en formación y una estructura topográfica adecuada para guiar al tejido en formación. (Carletti, et al, 2011; O'Brien, 2011).

Los materiales utilizados para fabricar andamios en ingeniería de tejidos pueden clasificarse en dos grandes grupos, los biomateriales naturales y los biomateriales sintéticos. Los primeros incluyen, cerámicas inorgánicas tales como fosfatos de calcio y polímeros orgánicos tales como proteínas, polisacáridos, lípidos y polinucleótidos (Abarrategi et al., 2012; Sobczak-Kupiec et al., 2012; Keothongkham et al., 2017; Li et al., 2017). Los biomateriales naturales generalmente tienen una excelente biocompatibilidad, por lo que las células se pueden unir y crecer con una excelente viabilidad. Los biomateriales sintéticos pueden clasificarse en inorgánicos, como los biovidrios y los orgánicos, como los polímeros sintéticos. En general, se piensa que los biomateriales sintéticos tienen propiedades físicas y mecánicas mejor controladas y se pueden usar tanto en tejidos blandos como duros. Sin embargo, para los biomateriales sintéticos, las células pueden tener dificultades para unirse y crecer en estos materiales, lo cual se convierte en un problema.

Los hidrogeles son andamios tridimensionales, compuestos de redes poliméricas hidrofílicas, los cuales se caracterizan por poder retener grandes cantidades de agua o fluidos biológicos, así como tener una consistencia blanda y elástica, la cual simula la de los tejidos vivos (Hoffman, 2002; Chan & Leong, 2008). Estos hidrogeles pueden infiltrarse fácilmente en otros materiales más rígidos y permear entre poros, con lo cual se pueden generar estructuras resistentes que ayuden al soporte de una lesión ósea y al mismo tiempo inyectar hidrogeles que contribuyan a la formación de tejido *de novo*.

Los hidrogeles tienen diversas clasificaciones, una de ellas es dependiendo del mecanismo de formación del mismo, la clasificación es la siguiente:

- Química o permanente; este tipo de hidrogeles se caracterizan por hacer la transición solido-gel posterior a una reacción química, la cual forma la red polimérica.
- Física o reversible; en este caso el gel se forma por interacciones no covalentes entre las cadenas de los materiales, por lo que la transición sólido-gel se da por cambios de pH (hidrogeles sensibles al pH), concentración de analitos (hidrogeles sensibles a analitos) y en especial interés para la aplicación biomédica se encuentran los hidrogeles termosensibles, los cuales se forman por cambios en la temperatura.

En cuanto a los hidrogeles termosensibles encontramos que los hay de dos tipos distintos, unos son aquellos que se gelifican enfriándolos por debajo de la temperatura superior crítica (UCGT por sus siglas en inglés) y los que se calientan por encima de la temperatura crítica de gelificación inferior (LCGT) para ser gelificados (Gioffredi et al., 2016).

Pluronic F127.

El Pluronic F127 o como se conoce genéricamente, poloxámero 407 es un copolímero formado por tres bloques de Polioxido de etileno, polioxido de propileno, polioxido de etileno (PEO PPPO PEO), así mismo es un compuesto no tóxico y aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos. FDA por sus siglas en inglés (Gioffredi et al., 2016).

Se han realizado estudios de citotoxicidad de este polímero sintético, ya que es de gran interés en la industria farmacéutica como un encapsulador de fármacos. Así mismo se han hecho algunos estudios de diferenciación de MSC que, aunque no se han hecho con células humanas (Huang et al., 2006) es un antecedente como un material con el potencial de ser un hidrogel aplicable como andamio en ingeniería de tejidos (Khattak, et al, 2005; Park et al., 2009; Yap & Yang, 2016).

Así mismo se tienen reportes del potencial que tiene el PF127 como un andamio que permite la viabilidad, la proliferación y la diferenciación de las células troncales

mesenquimales a linajes osteogénicos y adipogénicos. (Diniz et al., 2015; Vashi et al., 2008; Huang et al., 2006)

Gelatina.

La gelatina es una mezcla heterogénea de proteínas solubles en agua, las cuales tienen un alto peso molecular, muchas de estas proteínas son colágenas. Las colágenas de las cuales son extraídas de diversos tejidos como la piel, los ligamentos, los tendones, los huesos etc. Existen dos tipos de gelatinas, la gelatina tipo A, las cuales pasan por un proceso de extracción en un medio ácido y la gelatina tipo B las cuales pasan el proceso de extracción en un medio alcalino (Hafidz, et al, 2011; Lee, et al, 2016).

En varios estudios se ha observado que las matrices de gelatina ayudan en la diferenciación y mantenimiento de MSC a células de linaje óseo, se piensa que eso se debe a que contiene grupos funcionales presentes en la colágena, los cuales permiten el anclaje y señalización celular a través de las integrinas presentes en la membrana celular. (Obara et al., 2016; Oryan, et al, 2017; Kim et al., 2017).

En algunos trabajos se ha combinado la gelatina con algún otro material con el fin de promover la proliferación y la diferenciación osteogénica de las células troncales, se han utilizado fosfatos de calcio (Takahashi, et al, 2005; Hussain et al, 2012), quitosanos (Ratanavaraporn, et al, 2011) o factores de crecimiento como la BMP2 (Du et al., 2015).

IV. Justificación

Al existir diversos padecimientos que afectan la estructura y función del sistema óseo, como la osteoporosis, la osteogénesis imperfecta y las fracturas, es necesario ayudar a la reparación de los huesos. Por ello se propone utilizar técnicas de ingeniería de tejidos para generar un hidrogel el cual transporte células que ayuden en la síntesis, reparación y remodelación del hueso.

V. Hipótesis:

Según los antecedentes reportados, se logrará aislar células troncales mesenquimales derivadas de endometrio y podrán diferenciarse a un linaje óseo, así como podrán sobrevivir en un hidrogel termosensible con potencial aplicación en lesiones de hueso.

VI. Objetivo General.

Desarrollar un hidrogel con materiales termosensibles para el cultivo de células troncales mesenquimales del endometrio y su diferenciación al linaje óseo.

I. Objetivos específicos.

- Aislar células troncales mesenquimales derivadas del endometrio
- Caracterizar inmunofenotípicamente a las células
- Diferenciar las células troncales derivadas del endometrio a células de linaje óseo
- Desarrollar hidrogeles de gelatina, pluronic F127 y combinados
- Evaluar la viabilidad de las células sobre los hidrogeles.

VII. Metodología.

a. Materiales y reactivos.

Medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco Life Technologies).
Suero Fetal Bovino (Gibco Life Technologies).
Antibiótico antimicótico (Gibco Life Technologies).
PBS 1X (Gibco Life Technologies).
Ácido ascórbico (Sigma).
Human BMP - 4 (Prepotech).
Human BMP - 7 (Prepotech).
Dexametasona (Gibco Life Technologies).
EDTA 0.5 M (Gibco Life Technologies).
Tripsina EDTA 0.25% (Gibco Life Technologies).
PFA 4% (Gibco Life Technologies).
Acutasa (Sigma Aldrich)
Verseno 1X (Gibco Life Technologies).
Anticuerpo hCD105 Fluorocromo PE (BD)
Anticuerpo hCD44 Fluorocromo FITC (BD).
Anticuerpo hCD90 Fluorocromo APC (BD).
Anticuerpo hCD90 Fluorocromo FITC (BD).
Anticuerpo hCD166 Fluorocromo PE (BD).
Anticuerpo hCD73 Fluorocromo APC (BD).
Anticuerpo hCD45 Fluorocromo FITC (BD).
Anticuerpo hCD34 Fluorocromo PE (BD).
Anticuerpo hHLA-DR Fluorocromo APC (BD).
PBS10X (Gibco Life Technologies).
Tritón X-100 (Promega).
Tween-20 (Sigma).
Anti Runx2 goat polyclonal IgG (Santa Cruz).
Alexa four 488 donkey anti goat (Invitrogen).
Cell tracker violet (Thermo).
Live & Dead Kit de Calceina (Thermo).
Pluronic F127 (Sigma).
Gelatin from bovine skin type b (Sigma).
Cajas T25 (Cornig).
Cajas T75 (Cornig).
Cajas 48 pozos (Costar).
Tubos de 15 ml (Santa Cruz).
Tubos de 50 ml (Santa Cruz).
Tubos para citometría (Cornig).

b. Soluciones preparadas

Buffer de dilución: PBS+ antibiótico- antimicótico 10% + EDTA 2 mM.

Solución de Bloqueo PBS + Tritón X-100 0.5%.

Solución para permear PBS + Twen-20 0.1 % + FBS 1%.

c. Obtención de muestras:

Las muestras se obtuvieron de mujeres en un rango de edad de 18 a 28 años, las cuales usan copa menstrual y previamente firmaron la carta de consentimiento informado y llenaron el cuestionario aprobados por el comité de bioética del INR y se presentan en los anexos.

Las muestras, fueron obtenidas durante los primeros 3 días de sangrado. El contenido de la copa requerido, fue de mínimo 5 ml. Este fue vaciado en un tubo falcón de 50 ml, el cual contenía 5 ml de buffer de dilución.

d. Aislamiento de células troncales

Todo el proceso se realizó en frío, los reactivos y las muestras se trabajaron a 4°C. Primero se diluyó la muestra en una proporción 1:3 con buffer de dilución. Con ayuda de una pipeta de 10 ml se resuspendió la muestra y el buffer de dilución hasta homogeneizar completamente y deshacer los coágulos y pedazos de tejido en la muestra. En seguida se colocaron las muestras en tubos falcón de 15 ml y se añadieron 1.25 ml de ficoll a cada tubo, como se muestra en la figura 6. Posteriormente se añadieron 5 ml de muestra diluida, por tubo, quedando el ficoll en una proporción 1:1 con la cantidad de muestra sin diluir. Cuidando que se mantuvieran separadas las fases de ficoll y muestra cómo se observa en la figura 7, se debe vaciar lentamente la muestra para no mezclar las fases.



Figura 6. Material para el aislamiento con ficoll. En tubos falcón se agrega una tercera parte de la muestra que se colocó en cada uno de los tubos

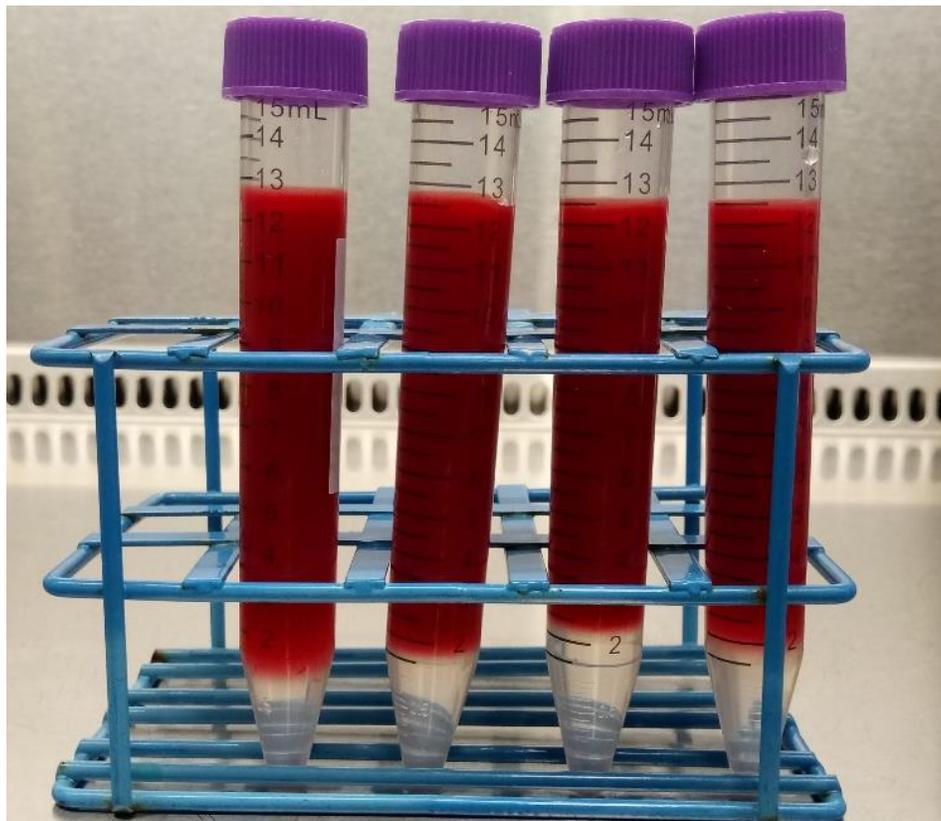


Figura 7. Ficoll con muestra. La sangre diluida en medio de transporte, por densidad, queda sobre el ficoll.

Una vez agregada la muestra, se centrifugaron las muestras a 400 g por 35 minutos; es importante quitar el freno de la centrifuga y posteriormente iniciar. Debido a esto el tiempo puede ser mayor hasta que se detenga el proceso.

Obtenida la diferencia de fases como se muestra en la figura 8, se retiró la primera fase (plasma) evitando tomar parte de la segunda fase (células mono nucleadas). Cuidadosamente se tomó la segunda fase y se colocó en un tubo falcón de 15 ml.

Una vez obtenidas las células, se realizaron dos lavados con PBS 1X con 10% de antibiótico-antimicótico, entre cada lavado se centrifugaron las células a 400 g por 5 minutos. Finalmente se agregó 1 ml de medio suplementado y se dividieron en 2 cajas de cultivo T25. 24 horas después se realizaron dos lavados con PBS 1X + 10% antibiótico antimicótico y se agregó medio suplementado fresco.

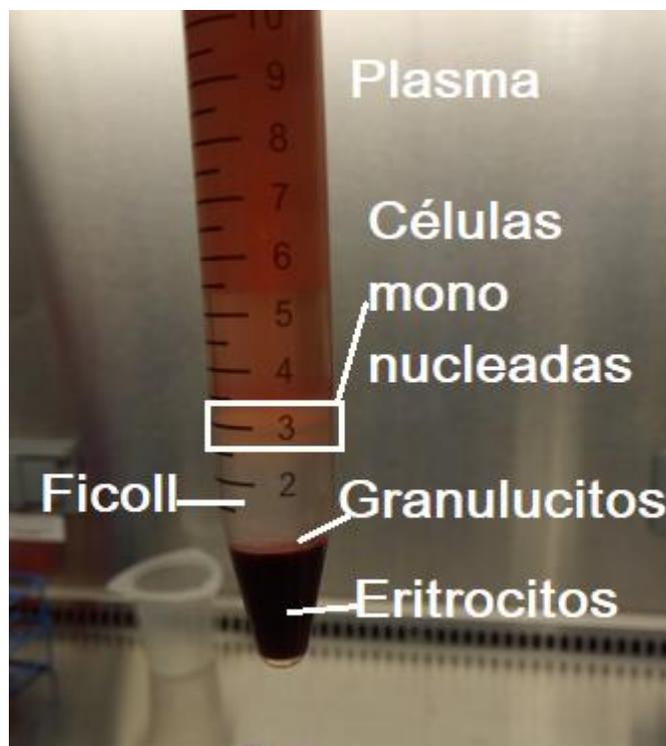


Figura 8. Gradiente de ficoll. Las fases que quedan después de centrifugar las muestras, las fases están en el siguiente orden, plasma, células mono nucleadas, ficoll, granulocitos y eritrocitos.

e. Caracterización de las eMSC por citometría de flujo.

Antes de realizar la citometría de flujo, se expandieron las células en cajas de cultivo T75 hasta que alcanzaron un 80% de confluencia.

Una vez en confluencia se retiró el medio de cultivo de las cajas y se realizaron 2 lavados de PBS durante 3 minutos, transcurrido ese tiempo se retiró el PBS.

En seguida se agregaron 5 ml de verseno 1X y se incubaron 5 minutos a 37° C. Transcurridos los 5 minutos se observó al microscopio y en caso de observarse desprendimiento celular, se colectan las células. En caso de no haber desprendimiento de células, se retira el verseno sin mayor cuidado.

Posteriormente se agregaron 3 ml de la solución de acutasa y se incubaron a 37° C durante 3 minutos, para despegar las células se dieron ligeros golpes a un costado de la caja de cultivo para facilitar el desprendimiento celular.

Pasados los 3 minutos se agregaron 3 ml de medio suplementado y se lavó la caja con ayuda de la pipeta. La suspensión celular fue colectada y trasladada a un tubo cónico de 15 ml.

La suspensión celular fue centrifugada a 1500 rpm por 8 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 5 ml de PBS para realizar un lavado y se centrifugó de nuevo a 1500 rpm por 5 minutos. Posteriormente se retiró el sobrenadante y posteriormente se resuspendió el pellet celular en 1 ml de PBS.

Se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer utilizando colorante vital de exclusión azul tripano. Cada ensayo requirió de una cantidad de $2.0 - 5.0 \times 10^5$ células. En cada tubo que se utilizó en cada ensayo se colocaron 2 ml de PBS. A cada tubo se le fue agregado el volumen necesario de la suspensión celular con la cantidad de células requeridas para el ensayo.

Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 8 minutos. Una vez finalizada la centrifugación se decantó cuidadosamente el sobrenadante para no perder el pellet celular.

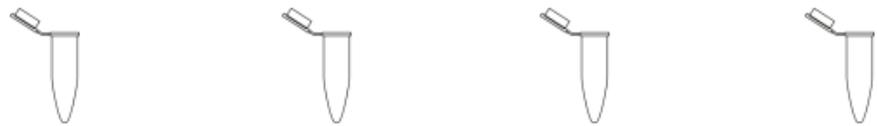
A cada tubo se le agregaron 100 μ l de PBS y se resuspendió cuidadosamente el pellet celular. En seguida agregaron 3 μ l de cada anticuerpo CDX específico a cada uno de los tubos en las combinaciones indicadas en la tabla 2.

Los tubos fueron incubados a 4 °C de 30-45 minutos y protegidos de la luz. Terminada la incubación, se agregaron 2 ml de PBS a cada tubo para lavar el excedente de anticuerpos. Después de los lavados tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 8 minutos.

Se desechó el sobrenadante y se fijaron las células en 1 ml de PFA al 2 %. Incubando las células durante 20 minutos a 4 °C protegidas de la luz. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 10 minutos.

Finalmente se decantó cuidadosamente el sobrenadante, evitando perder el pellet celular y se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS. Los tubos fueron almacenados a 4°C protegidos de la luz hasta su lectura.

Una vez marcadas las células con los anticuerpos se procedió a hacer la lectura en citómetro BD FACS Aria III.. Las muestras se leyeron a una longitud de onda específica para cada fluorocromo tal como se describe en la tabla 3.



TUBO:

1	2	3	4
Control	hCD90 FITC	hCD44 FITC	hCD45 FITC
	hCD105 PE	hCD34 PE	hCD166 PE
	hHLA-DR APC	hCD 73 APC	h CD90 APC

Tabla 2. Lista de anticuerpos para citometría de flujo. Las columnas representan los tubos utilizados para realizar la citometría de flujo, en las filas se observan los anticuerpos que fueron colocados en cada tubo, así como el fluoróforo al que están asociados.

Fluorocromo	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión	Láser utilizado
Aloficocianina (APC)	650 nm	660 nm	Láser rojo
Fluoresceína (FITC)	494 nm	520 nm	Láser azul
Ficoeritrina (PE)	496, 532 y 561 nm	578 nm	Láser Azul y amarillo-verde

Tabla 3. Características de fluoróforos. Los fluorocromos utilizados en la citometría de flujo, tienen distintas características en cuanto a la longitud de onda a la que se excitan y emiten alguna señal.

f. Ensayos de diferenciación.

Se prepararon 10 ml de medio de diferenciación osteogénica, en la tabla 4 se muestran los reactivos necesarios, así como la concentración en la que fueron utilizados, de acuerdo al protocolo del laboratorio de biotecnología del INR. Fueron diluidos en DMEM-F12

Reactivo	Concentración del stock	Concentración final
BMP-4	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	10 ng/ml
BMP-2	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	100 ng/ml
Ácido ascórbico	20 mg/ml	0.05 mM
Dexametasona	10 mM	100 nM
Antibiótico antimicótico		1%
FBS		1%

Tabla 4. Medio de diferenciación. Se muestran las concentraciones de stock y de trabajo para el medio de diferenciación.

Primero se cultivaron eMSC, a una confluencia del 80% en cajas T25.

Una vez en confluencia se realizaron dos lavados con PBS 1X. Posteriormente se despegaron estas células con 2 ml de tripsina EDTA 0.25% diluida en una proporción 1:4 en PBS 1X. Se dejaron incubando por cinco minutos a 37 °C. Transcurridos los cinco minutos, se añadieron 2 ml de medio y lavar la caja.

La suspensión de células, fue colocada en un tubo falcón de 15 ml y se centrifugo por cinco minutos a 1500 rpm. Finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, e inmediatamente se añadió 1 ml de medio suplementado y se resuspendió el pellet celular.

Se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer utilizando colorante vital de exclusión azul tripano, añadiendo 10 μl del colorante a 10 μl de la suspensión celular. Se requirieron de 48,000 células para este ensayo (2000 por pozo).

Se dejaron en cultivo por 10 días, el último día de cultivo se fijaron las células con PFA al 4% para posteriormente realizar las inmunofluorescencias

a. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se realizó a las células que se utilizaron en el ensayo de diferenciación, una vez transcurridos 14 días en cultivo con medio de diferenciación osteogénica.

Se comenzó retirando el medio de cultivo a las células y se les hizo un lavado con PBS. Enseguida se fijaron las células, por lo cual se añadieron 300 μ l de PFA al 4% y se dejó con las células durante cinco minutos.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS, cada uno de los lavados duro cinco minutos. Inmediatamente se agregaron, a cada pozo, 300 μ l de solución permeabilizante por 20 minutos.

Transcurridos los 20 minutos, se hicieron nuevamente 3 lavados de 5 minutos con PBS. Después de los 3 lavados, se agregaron 300 μ l de solución de bloqueo a cada uno de los pozos. Esta solución se dejó en lo pozos durante 30 minutos.

Pasada la media hora se vaciaron los pozos y se añadió el anticuerpo primario anti-HRunx2 (Santa Cruz) y anti- OCN, el cual estaba diluido 1:50 y anticuerpo anti CD73 diluido 1:50 en solución de bloqueo igual que al anti Runx2. Se dejó en incubación y agitación a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS, estos duraron 10 minutos cada uno y se realizaron en agitación. Finalizados los lavados, se añadió el anticuerpo secundario (anti cabra IG), el cual se diluyo 1:250 en solución de bloqueo. De este anticuerpo se añadieron 50 μ l y se dejó incubando por 2 horas en agitación, a temperatura ambiente y cubierto de la luz. En la tabla se muestran el acomodo de los anticuerpos y el correspondiente fluorocromo.

Terminada la incubación se hicieron 3 lavados de 15 minutos, con PBS. Se continuo el proceso tiñendo los núcleos con DAPI 1:1000. Finalmente se hicieron 3 lavados con PBS por 10 minutos y se observaron las células en el microscopio de fluorescencia.

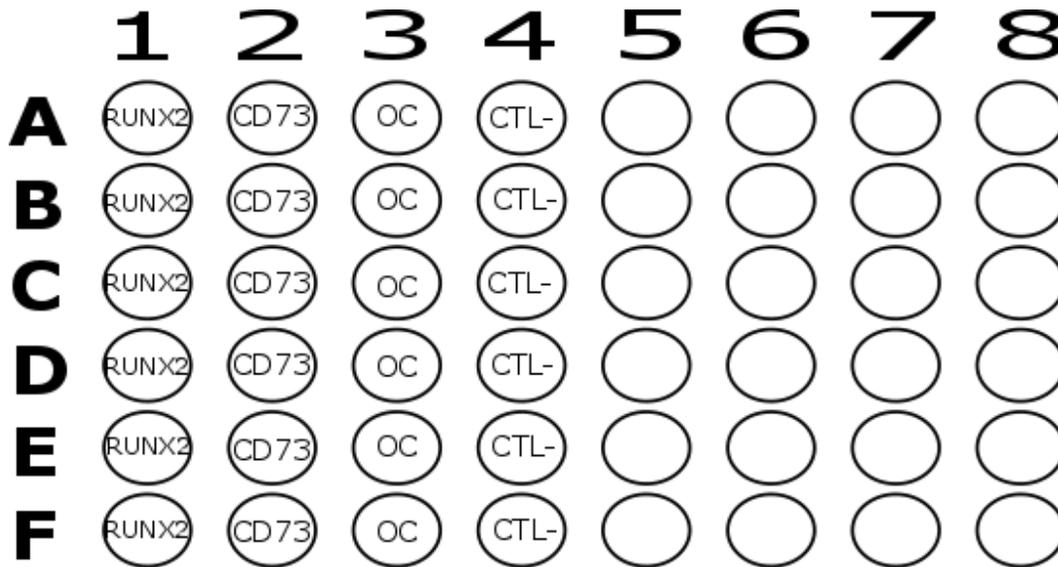


Figura 12. Distribución de los anticuerpos primarias en la placa de cultivo. Se realizaron 6 repeticiones de cada anticuerpo primario. A los anticuerpos anti RUNX2 y anti OC (osteocalcina) se le añadieron anticuerpos acoplados al fluoróforo Alexa 488. Mientras que el anti CD73 estaba acoplado a PE

b. Ensayos de cultivo en hidrogel

Preparación de gelatina: La gelatina se preparó inicialmente a distintas concentraciones, esto fue para elegir la concentración que presentara la característica de viscosidad más fácil de trabajar y que a su vez se logrará la formación de un hidrogel.

Se probaron concentraciones en porcentaje masa/volumen. (wt%/v%)

Las concentraciones probadas fueron las siguientes:

Prueba	Peso	Volumen	Concentración
1	0.3 g	2 ml	15 %
2	0.5 g	2 ml	25 %
3	0.7 g	2 ml	35 %
4	0.9 g	2 ml	45 %

Tabla 5. Concentraciones de los hidrogeles de gelatina. Tras realizar varias pruebas con distintas concentraciones de gelatina, se tomó la decisión de usar la concentración de 25%.

Para preparar la gelatina, primero se pesó la cantidad necesaria de gelatina en polvo, posteriormente en un matraz Erlenmeyer de 25 ml se agregó la cantidad de PBS necesario. El matraz fue sellado con un tapón de algodón y gasa y se puso en agitación a 100° C. Una vez completamente diluida la gelatina, se ajustó el pH con hidróxido de sodio (NaOH) 5 N.

Antes de utilizarse se esterilizó en UV por 30 minutos.

Basado en la consistencia aparente del gel resultante se tomó la decisión de trabajar con la concentración del 25%.

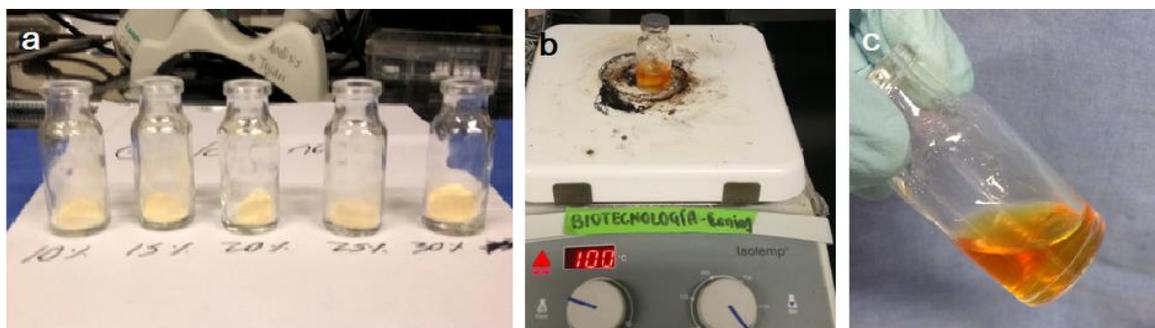


Figura 9. Proceso realizado para preparar la gelatina. a) Se observan los recipientes con la gelatina en polvo necesaria para preparar 2ml a diferentes concentraciones (10%,15%, 20%, 25% y 30%). En el inciso b) se observa la manera en la cual se diluyó la gelatina, esto en con ayuda de la parrilla de agitación a 100° c) Finalmente en el inciso se observa cómo queda la gelatina antes de ajustar el pH.

c. Preparación de PF127

Al igual que la gelatina se probaron distintas concentraciones de Pluronic F127, las cuales se muestran a continuación:

Prueba	Peso	Volumen	Concentración
1	0.5 g	2 ml	25 %
2	0.7 g	2 ml	35 %
3	0.8 g	2 ml	40 %
4	0.9 g	2 ml	45 %

Tabla 6. Concentraciones de los hidrogeles con PF127. Tras realizar varias pruebas con distintas concentraciones de PF127, se tomó la decisión de usar la concentración de 35 %.

Para preparar el Pluronic F127 primero se pesó la cantidad necesaria del polvo, esto se realizó en un tubo falcón de 15 ml. Una vez pesada la cantidad necesaria, se agregó la cantidad necesaria de PBS 1X, el cual se enfrió previamente a 4°C. Posteriormente se puso en agitación en el vórtex por cinco minutos, pasados los cinco minutos se enfrió la mezcla, por lo cual se sumergió por cinco segundos en nitrógeno líquido. Enseguida con ayuda de una pipeta se separaron de las paredes del tubo los residuos del Pluronic F127. Además, con ayuda de la parrilla de agitación y un vaso de precipitado con agua y hielos se siguió el proceso de dilución. Una vez completamente diluido, se centrifugo a 4400 rpm por 30 segundos, con el fin de eliminar las burbujas generadas por la agitación. Antes de ocuparse se mantuvo en refrigeración a 4 °C, lo cual lo mantuvo en una fase líquida.

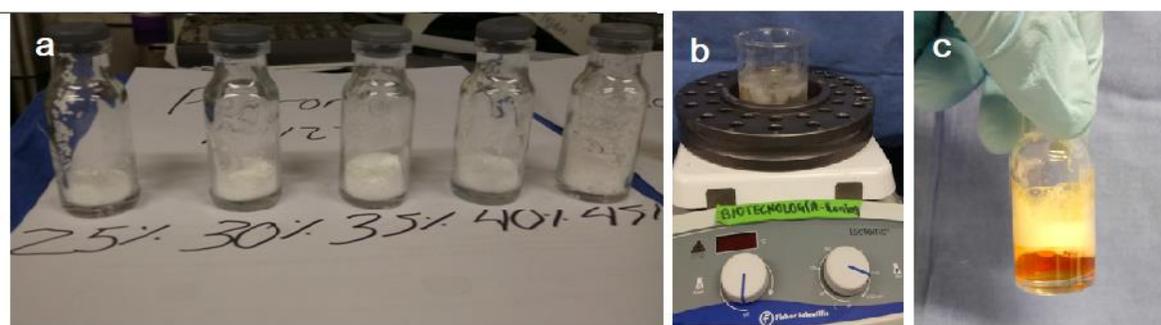


Figura 10. Proceso realizado para preparar el PF127. a) Se observan los recipientes con el pluronic en polvo necesario para preparar 2ml a diferentes concentraciones (25%, 30%, 35%, 40% y 45%). En el inciso b) se observa la manera en la cual se diluyó el PF127, esto en con ayuda de la parrilla de agitación y un vaso de precipitado con agua con hielos. Finalmente, en el inciso se observa cómo queda el pluronic antes de ajustar el pH y centrifugar.

d. Cultivo celular en los hidrogeles.

Antes del ensayo se cultivaron eMSC a una confluencia del 80% en cajas T25. Primero se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente se despegaron estas células con 2 ml de tripsina EDTA 0.25% diluida en una proporción 1:4 en PBS. Se dejaron incubando por cinco minutos a 37 °C. Transcurridos los cinco minutos, se añadieron 2 ml de medio y se lavó la caja. La suspensión de células, fue colocada en un tubo Falcón de 15 ml y se centrifugó por cinco minutos a 1500 rpm.

Finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante e inmediatamente se añadió 1 ml de medio suplementado y se resuspendió el pellet celular. Se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer utilizando colorante vital de exclusión azul tripano, añadiendo 10 µl del colorante a 10 µl de la suspensión celular. Se requirieron de 800,000 células por ensayo. Se utilizaron cajas de 12 pozos, en cada uno de los pozos utilizados se cultivaron 50,000 células.

Para sembrar las células control primero se añadió 1 ml de medio a cada pozo, en seguida se añadió el volumen de células necesario y se resuspendió.

Con el cultivo de células en gelatina se añadieron 500 µl de gelatina al 25% al pozo y posteriormente se añadió el volumen necesario de células, se resuspendió y se agregaron otros 500 µl de gelatina.

En el cultivo con PF127 se siguió el mismo proceso que en el cultivo con gelatina, es decir, se añadieron primero 500 µl de pluronic, posteriormente el volumen de células, se resuspendió y se agregaron otros 500 µl del hidrogel.

Finalmente se realizó el hidrogel combinado, para el cual primero se añadieron 500 µl de gelatina al pozo y posteriormente se añadieron las células, se resuspendió y se agregó el PF127, se volvió a resuspender.

Por último, se añadieron 100 µl de medio suplementado a todos los pozos. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente (20°C) sin embargo la temperatura de la gelatina fue de 40 °C y la temperatura del PF127 de 4°C.

Finalmente se incubaron a 37° C por 24 horas para posteriormente ser vistas en el microscopio de fluorescencia.

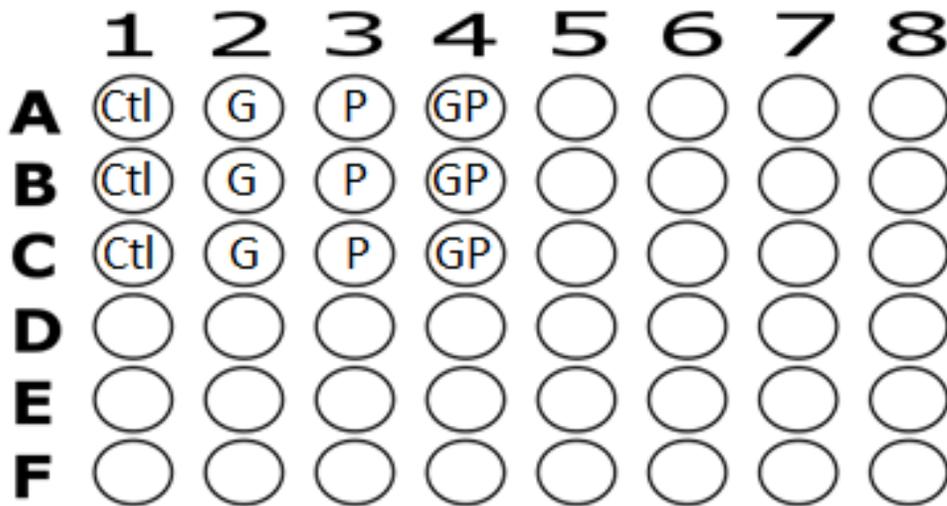


Figura 11. Distribución de los hidrogeles en la placa de cultivo. Ctl es el control, en donde se cultivaron solo eMSC. G son los pozos donde se agregaron 200 μ l de gelatina. P son los pozos en los cuales se colocaron 200 μ l del gel de PF127. GP en estos pozos se combinaron 100 μ l de gelatina y 100 μ l de PF127.

e. Ensayos de viabilidad

Se realizaron ensayos de viabilidad para determinar si se observaban diferencias entre el Pluronic F127, la gelatina y el hidrogel combinado.

Los primeros ensayos que se realizaron se hicieron con calceína/homodímero de etidio, para lo cual, antes de cultivar las células, mientras estaban en 2 μ l de medio sin suplementar, se les añadió 0.5 μ l de calceína y 0.5 μ l de homodímero de etidio y se incubó la durante 30 minutos.

Posteriormente se centrifugaron las células a 1500 rpm por 5 minutos y se realizó un lavado con medio suplementado, este paso se repitió dos veces. Finalizada la media hora de incubación, se sembraron las células como se mencionó anteriormente, en los hidrogeles.

f. Marcaje con cell tracker violet

Para detectar las células dentro de los hidrogeles se tiñeron con cell tracker violet antes de ser cultivadas en el hidrogel. Las células obtenidas de la tripsinización de las cajas de cultivo T75 se pusieron en medio DMEM-F12 sin suplementar, antes de realizar el conteo. Una vez realizado el conteo celular y obtenidas las células necesarias, a estas se les agregó más medio sin suplementar, llevándolas a un volumen de 2 ml. En este momento se añadió 1 μ l de cell tracker violet. En seguida se incubó la suspensión celular durante 30 minutos, todo el tiempo cubiertas de la luz. Finalizada la media hora de incubación, se sembraron las células como se mencionó anteriormente, en los hidrogeles.

IX. Resultados

a. Aislamiento y cultivo celular

Se obtuvieron 9 muestras de diferentes mujeres menores de 28 años y mayores de 18, empleado una copa menstrual. Las mujeres firmaron previamente la carta de consentimiento informado y llenaron el cuestionario correspondiente. De las nueve muestras obtenidas, tres resultaron contaminadas y fueron descartadas.

Así mismo de cada muestra se obtuvieron en promedio 25,656,222 células, de las cuales aproximadamente solo el 0.018%, es decir, alrededor de 4,535 células fueron adherentes y mostraron una morfología de fibroblasto. En la tabla 7, se muestra la información más relevante de las muestras obtenidas.

Es importante mencionar que en la muestra donde se obtuvo menor número de células, la donadora refirió el uso de dispositivo intra uterino (DIU) de cobre.

Así mismo, por el comportamiento general de las muestras, se propone que a mayor edad de la donante disminuye el número de células obtenidas, además de que al obtener una cantidad mayor a 25,000,000 células aumentan la probabilidad de contaminación. También se observa que el número de células disminuye considerablemente una vez realizados los lavados después de 24 horas de cultivo.

El desarrollo del cultivo de las células aisladas desde el día 0, es decir el día que se realizó el aislamiento de las células, hasta el día que se alcanzó un 80% de confluencia. Se puede apreciar cómo van cambiando de morfología, así mismo se aprecia la disminución de células a causa de los lavados.

Numero de Muestra	Clave de la muestra	Edad en años	Volumen de la muestra	Numero de células obtenidas	Numero de células adheridas	Porcentaje de células adheridas
1	AC	21	15 ml	24687000	4937	0.02%
2	AM	22	10 ml	38456000	3845	0.01%
3	AR	21	5 ml	25000000	7500	0.03%
4	CH	24	10 ml	27857000	5571	0.02%
5	EB	24	5 ml	25856000	2585	0.01%
6	KS	20	5 ml	26574000	0	0
7	KV	22	10 ml	23654000	4730	0.02%
8	MM	28	10 ml	20455000	6136	0.03%
9	NO	27	10 ml	18367000	5510	0.03%
Promedio		23	8.8 ml	25656222	4535	0.018%

Tabla 7. Datos de las muestras. A las muestras se les dio una clave para diferenciarlas (letras mayúsculas). Cada muestra tuvo un número de células totales aisladas y un porcentaje de células que se adherieron distintas, ya que se dieron varios factores variables como la edad de las donantes y la cantidad de muestra que donaron. Los espacios en rojo representan muestras contaminadas.

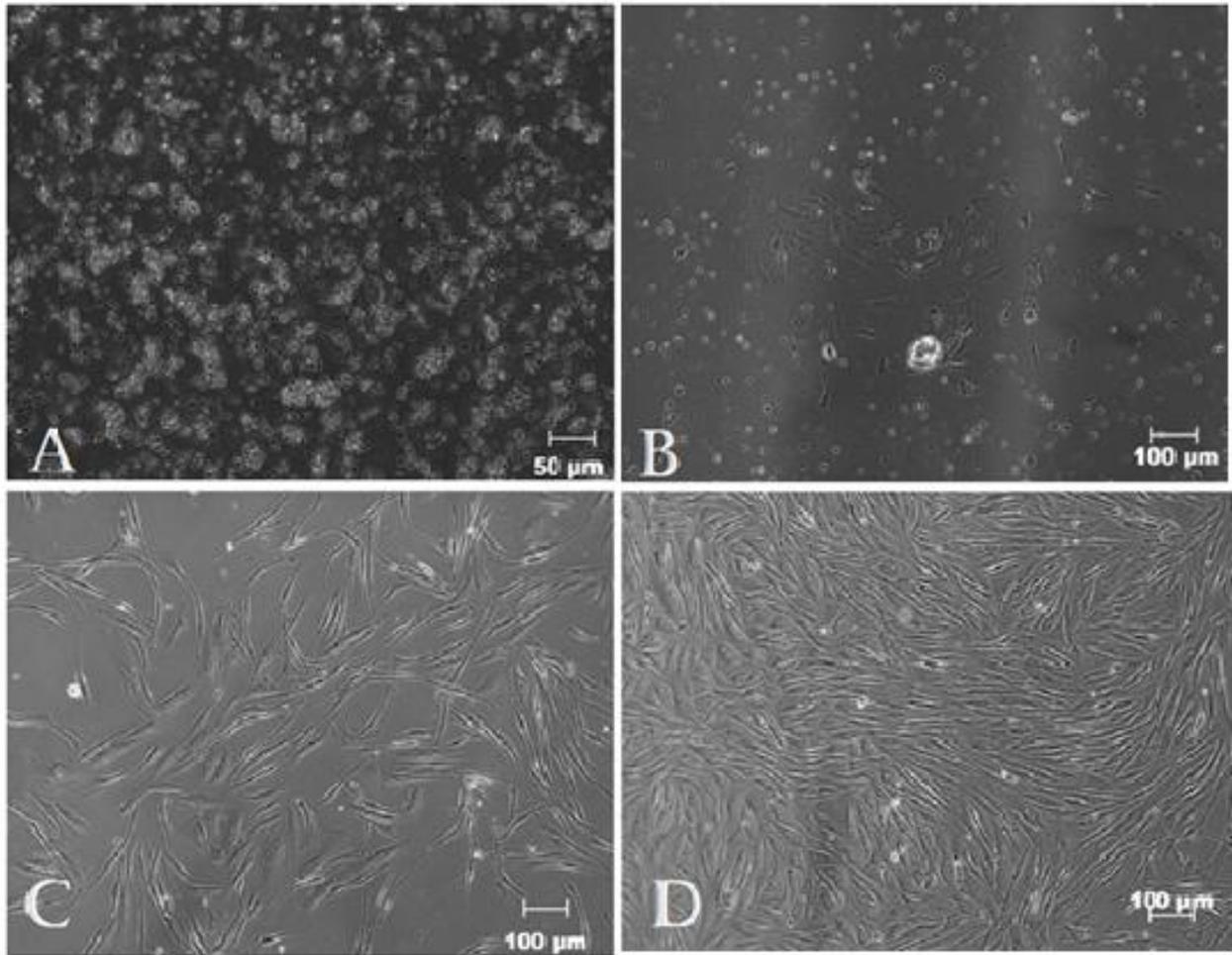


Figura 13. Evolución del cultivo primario de eMSC. En la micrografía A) se observó el cultivo del día 0 donde se observaron todas las células mononucleadas, que fueron aisladas. En la micrografía B) se observó crecimiento de células adherentes con morfología “alargada” 24 h después del aislamiento. En la micrografía C) Las células adquieren morfología alargada después de 5 días de cultivo D) y forman colonias que promueven la confluencia del cultivo después de 10 días.

b. Caracterización inmunofenotípica de las eMSC por citometría de flujo.

Para caracterizar las eMSC se analizaron los marcadores CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 y HLA mediante citometría de flujo. En este ensayo se utilizaron células en fase 2. Los resultados se muestran en la tabla 8 en la figura 14 y en la gráfica 1.

Las poblaciones celulares analizadas, tienen en promedio, los marcadores CD73 y CD90 por encima del 90%, es decir, que más del 90 % de la población es positiva a estos marcadores. Sin embargo, el CD105 apenas supera el 20%. Por otra parte, los marcadores negativos, es decir el CD34, CD45 y HLA, se encuentran por debajo del 0.8 %.

Los Marcadores CD 44 y CD 166 se colocaron como parte de un protocolo el cual pretende estandarizar más marcadores en las células troncales. En estos marcadores observamos que el CD 166 se comporta como un marcador negativo, manteniéndose por debajo del 5%, mientras que el CD 44 lo encontramos en mayor proporción que el CD105, sin embargo, al igual que este, no llegan a estar en el 50 % de la población.

Muestra	HLA-DR	CD34	CD44	CD45	CD73	CD90	CD105	CD166
AC	1.10%	0.90%	13.60%	1%	98.30%	98.80%	6.80%	1.90%
AR	0.10%	0.70%	37.20%	0.70%	99%	76.80%	21.50%	3.20%
EB	0.28%	1.40%	86.60%	0.66%	72.79%	87.16%	40.43%	14.27%
KV	0.10%	0.50%	42.12%	0.40%	98.60%	89.80%	18.10%	1.70%
MM	1.70%	0.50%	82.60%	0.50%	100%	99.70%	52.03%	2.50%
NO	0.40%	0.60%	10%	1.50%	89.40%	94.80%	2.20%	2%
Promedio	0.61%	0.77%	45.35%	0.79%	93.02%	91.18%	23.51%	4.26%

Tabla 8. Resultados de la citometría de flujo. Se obtuvieron los porcentajes de cada uno de los marcadores, siendo los más altos el CD 90 y el CD73, ambos arriba del 90% en promedio y por debajo del 1% los marcadores CD34, CD45 y HLA-DR, lo cual coincide con la definición de MSC.

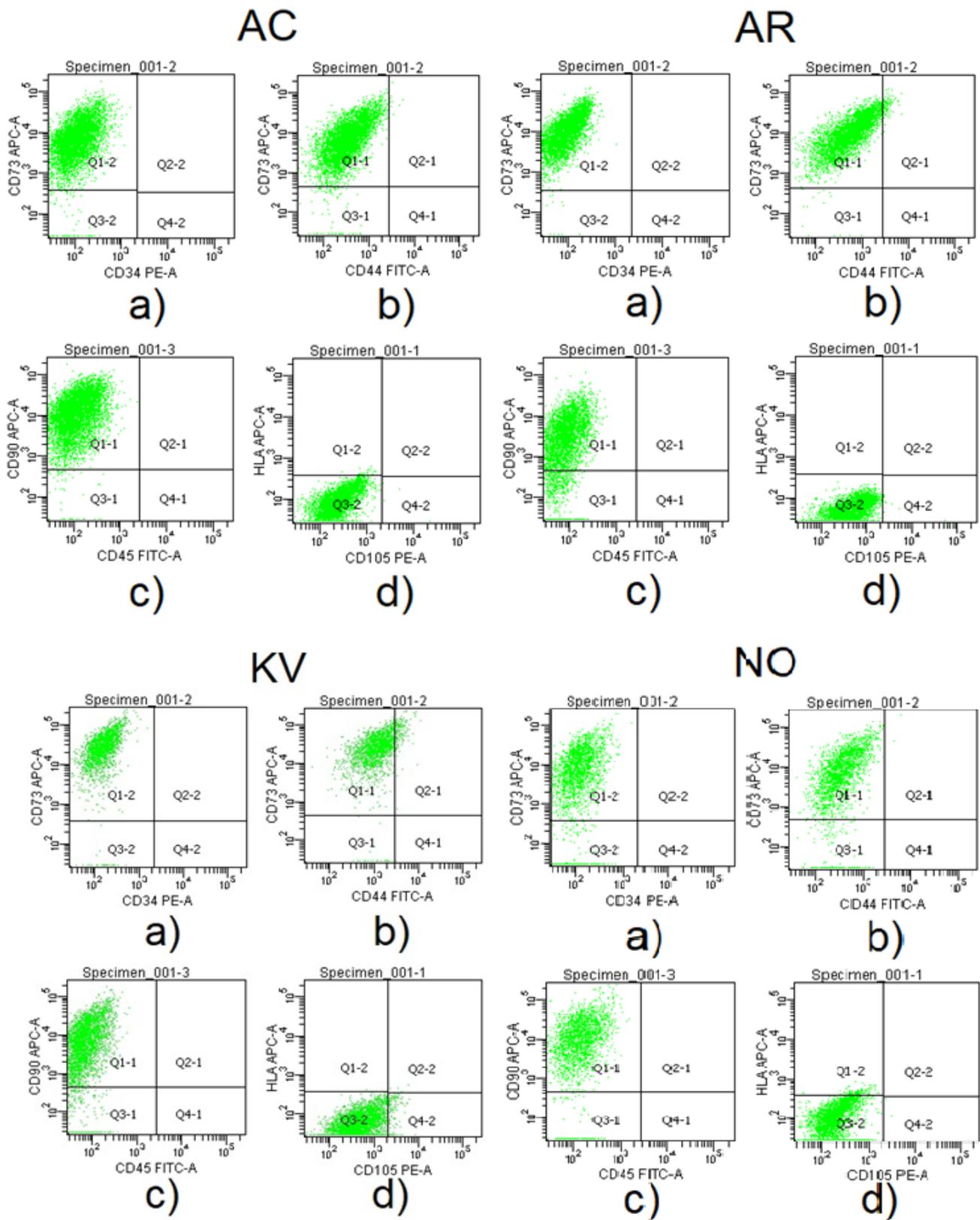
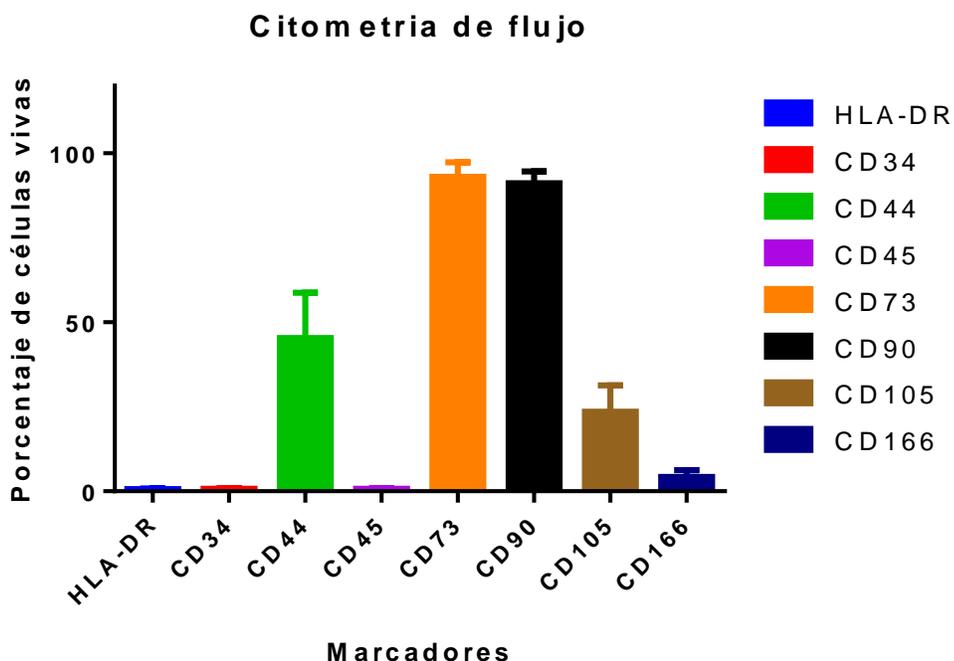


Figura 14. Resultados de la citometría de flujo En los incisos a) se muestran los resultados a los marcadores CD34 y CD73, en el b) son los resultados para CD44 y CD73, en el c) los resultados de CD45 y CD90 y en el d) los resultados de CD105 y HLA.



Gráfica 1. Promedios de los resultados de las citometrías de flujo. Los promedios más altos son los de los marcadores CD73 y CD 90, al igual que el CD44 sin embargo en este ultimo hay una SD mayor que en los otros dos.

c. Inmunofluorescencia.

La manera de demostrar la capacidad de diferenciación y además rectificar que las eMSC son una buena fuente de células para terapia, se realizó la diferenciación a un linaje osteogénico, a su vez para poder demostrar que las células se diferenciaron a este linaje óseo, se realizó una inmunofluorescencia, buscando al factor de transcripción RUNX2, así como a la proteína osteocalcina, la cual es característica de las células de hueso, por otra parte se buscó también el marcador de superficie CD73, este último fungió como control, ya que las células no diferenciadas lo presentarían mientras las células diferenciadas carecerían de él. Durante diez días se monitoreo el cultivo celular de eMSC, en la figura 15, se observan las eMSC tratadas con un medio DMEM-F12 suplementado con 1% de BFS y 1% de antibiótico antimicótico (CTL). Se puede observar que con el paso de los días las células presentan la morfología característica de las MSC, es decir, alargadas(A) (C)(E).

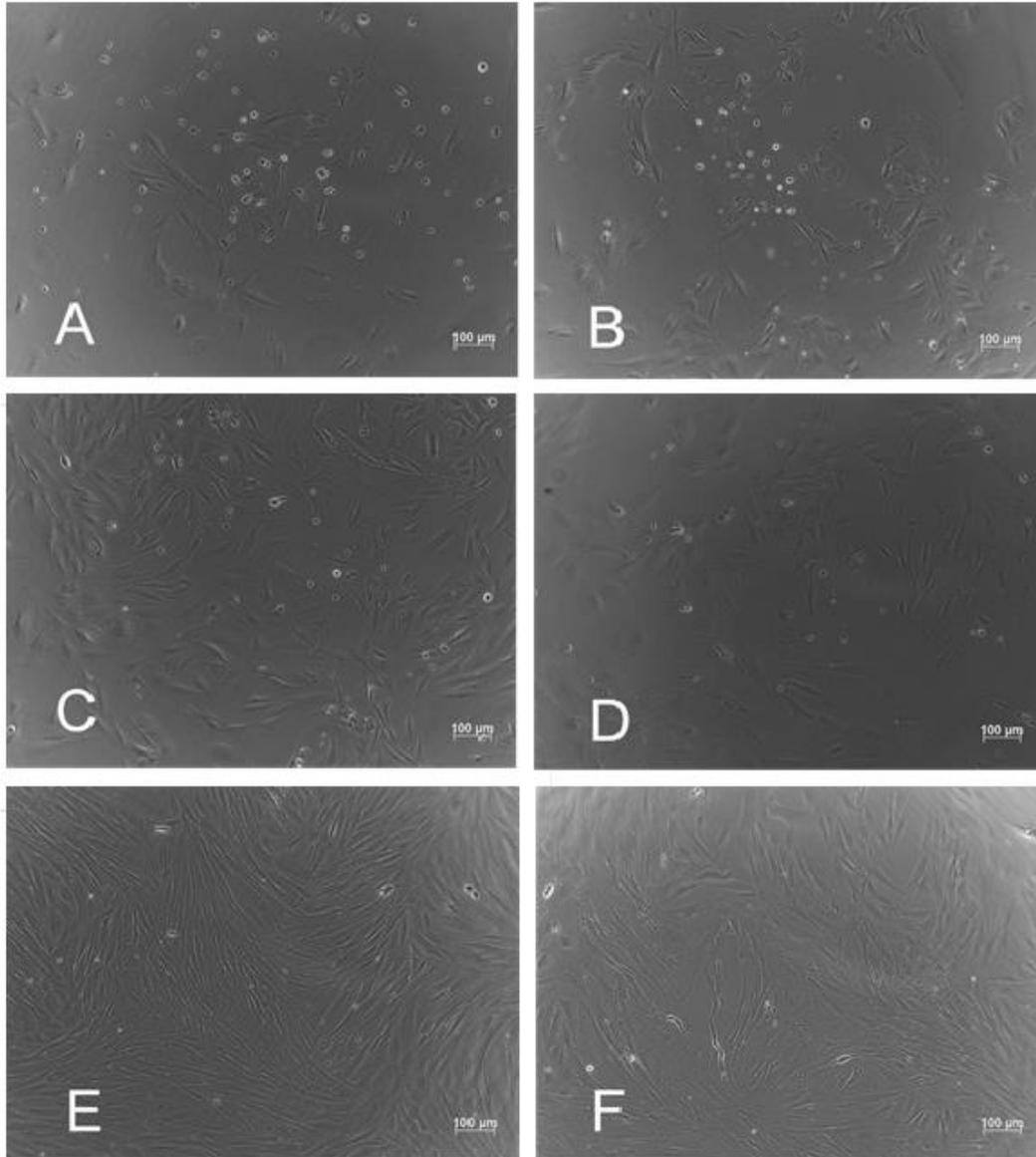


Figura 15. Evolución de diferenciación. El inciso A (día 1), C (día 5) y E (día 10) son de células sin tratamiento de diferenciación, mientras las B (día 1), D (día 5) y F (día 10) son imágenes de células con el tratamiento de diferenciación.

Por otro lado, las células que corresponden a las células tratadas con el medio de inducción osteogénica (DMEM-F12 suplementado con 10 ng/ml de BMP-4, 100 ng/ml de BMP2, 0.05 mM de ácido ascórbico, 100 nM de dexametasona, 1% de FBS y 1% de antibiótico antimicótico) (B)(D)(F). En estas las células presentan dos características diferentes a las de las MSC, la primera es que disminuye su capacidad de proliferación y la segunda es la morfología, la cual se hace más circular, con prolongaciones de citoplasma y un núcleo grande.

Por estas características se puede pensar que las células sí se están diferenciando a un linaje osteogénico, sin embargo, se realizó una inmunofluorescencia para comprobarlo.

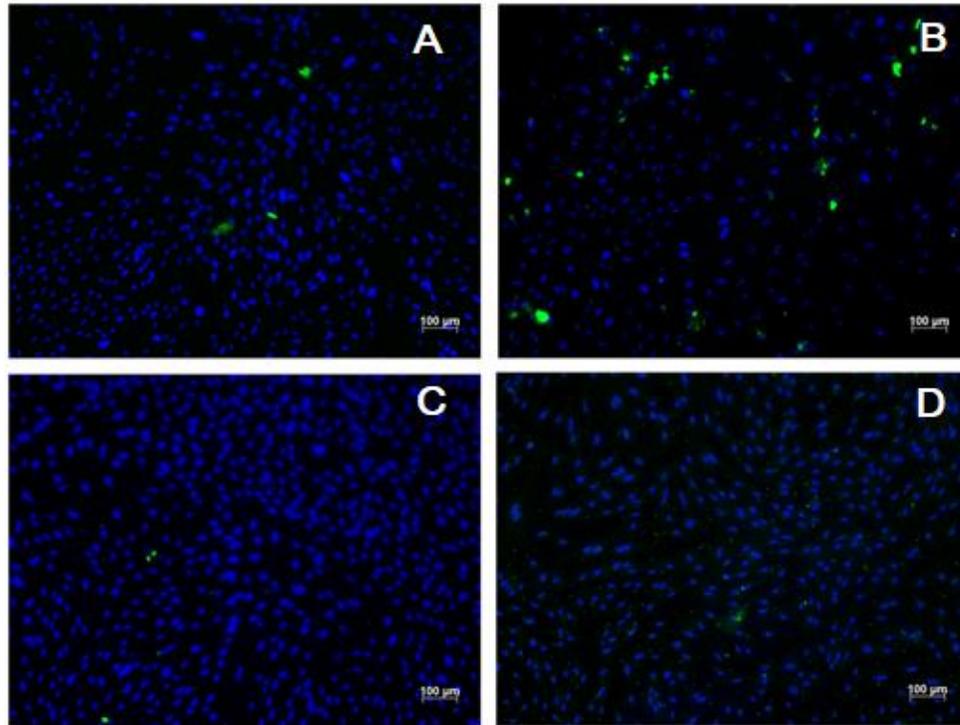


Figura 16. Detección de osteocalcina (OC) en eMSC. Los resultados de las inmunofluorescencias, de osteocalcina, en los controles (A) (B) Y (C) se pueden observar señales de (Alexa 488) lo cual se piensa pueden ser precipitados del anticuerpo. (D) Se puede apreciar un poco de señal en la inmunofluorescencia de las células diferenciadas.

En la inmunofluorescencia se buscaron dos marcadores positivos para células de linaje óseo, estos fueron el RUNX2 y la osteocalcina (figura 16 (D)). Por otro lado, se buscó un marcador característico de las eMSC, se determinó que sería el CD 73 ya que, en la inmunotipificación por citometría de flujo, fue el marcador más alto. Este marcador se utilizó para verificar que las células ya no eran eMSC.

En el CTL – y en CTL (Fig 16(A)(B)), se observan algunos puntos verdes, los cuales no deberían de aparecer. Sin embargo, por el tamaño, la forma y la distribución parecen ser agregados del anticuerpo del fluoróforo, por lo cual en los demás tratamientos también se tiene la interferencia de estos. Estos puntos se siguen viendo en los tratamientos en los que se utilizó el fluoróforo Alexa 488.

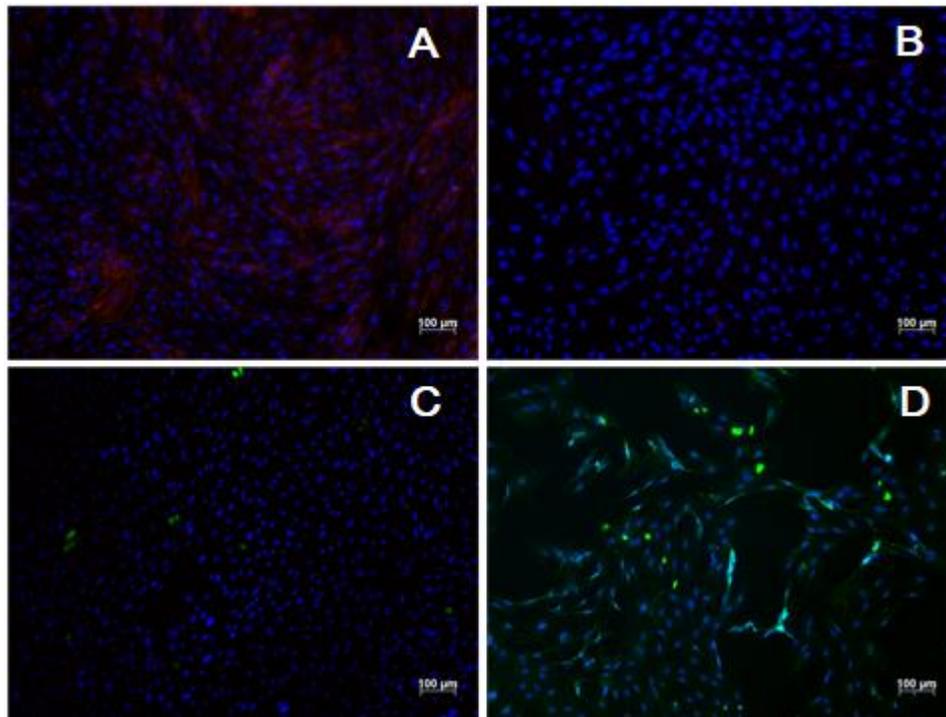


Figura 17. Detección de RUNX2 y CD73. Las células macadas con CD73 y no diferenciadas (A) tienen la marca alrededor del núcleo, en la membrana celular, mientras que las células diferenciadas no presentan la marca del CD73 (B). La inmunofluorescencia anti RUNX2 se observó que las células no diferenciadas (C) no presentan marca, sin embargo, en las células diferenciadas (D) sí existe señal.

Debido a lo anterior es probable que el resultado más importante sea el que se observa en el marcador CD 73 (Fig17 (A)), ya que el fluorocromo ya está acoplado y no se observan cristales. En este marcador se observa que en las células control, todo el citoplasma se ve rojo, mientras que en tratamiento de diferenciación no se observa el citoplasma rojo, es decir hay ausencia de ese marcador.

En el RUNX2 (Fig. 17(D)) y la osteocalcina (Fig. 16 (D)) es más difícil apreciar algún resultado significativo, ya que debido a los cristales se tiene que dar mayor tiempo de exposición al canal de fluorescencia “verde” por lo cual el fondo se aprecia un poco de este color. Sin embargo, sí es posible ver, en el tratamiento de diferenciación, que el citoplasma de las células marcadas con osteocalcina se ilumina de verde y en el caso del RUNX2 es posible apreciar señal de fluorescencia en el citoplasma, así como la colocalización de señal de Alexa 488 y de DAPI, lo cual indica la presencia del factor de transcripción en el núcleo.

d. Desarrollo de los hidrogeles.

A falta de pruebas de rigor para los materiales, como lo son el área de contacto, viscoelasticidad y rigidez, la elección de la concentración con la cual se trabajó el hidrogel se realizó a partir de la estabilidad estructural que esta presentó, así como el tiempo que le tomaba pasar del estado líquido al estado sólido y la consistencia que tenía posterior a agregarle un poco de medio y dejarlo en incubación por 24 horas. El hidrogel de gelatina que se optó utilizar fue el de una concentración de 25 %, ya que al momento de tomarlo con la micropipeta causaba menos problemas que el de 30 %, sin embargo, para mantener una mayor viscosidad posterior a agregar el medio, se podrían probar concentraciones más altas. En la tabla 9 se muestran las características de los hidrogeles de gelatina.

Concentración	Temperatura de dilución	Tiempo de gelificación	pH en PBS	Consistencia post incubación
10%	50 °C	16 minutos	7	Líquida
15%	75 °C	10 minutos	8	Líquida
20%	100 °C	6 minutos	8	Líquida
25%	100 °C	4 minutos	9	Viscosa
30%	100° C	5 minutos	9	Viscosa

Tabla 9. Datos de la fabricación de gelatina. Pruebas del hidrogel de gelatina desde la concentración utilizada, la temperatura en la cual se diluyó, el pH con el cual quedaba después de la dilución, el tiempo que tardaba en gelificar la muestra y la consistencia que tenía después de agregar un poco de medio e incubar.

Por su parte, en el hidrogel de pluronic F127 se eligió la concentración de 35 %. La elección de esta concentración se debió en mayor medida a la consistencia que tuvo el hidrogel después de agregarle medio, ya que mantenía una consistencia viscosa y no sólida como las concentraciones más altas o líquida como las concentraciones más bajas.

Concentración	Temperatura de dilución	Tiempo de gelificación	pH en PBS	Consistencia post incubación
25%	4° C	30 minutos	7	Líquida
30%	4° C	25 minutos	7	Líquida
35%	4° C	15 minutos	7	Viscosa
40%	0° C	12 minutos	7	Solida
45%	0° C	5 minutos	7	Solida

Tabla 10. Datos de la fabricación de PF127. Se muestran los resultados de las pruebas del hidrogel de pluronic F127, desde la concentración utilizada, la temperatura en la cual se diluyó, el pH con el cual quedaba después de la dilución, el tiempo que tardaba en gelificar la muestra y la consistencia que tenía después de agregar un poco de medio e incubar.

Una vez elegidas las concentraciones ideales de cada hidrogel independiente, es decir el hidrogel puro de gelatina y el hidrogel puro de PF127 se realizó la combinación de ambos para obtener el tercer hidrogel.

Este hidrogel combinó la gelatina con el PF127, sin embargo, había cierto porcentaje de estos que quedaban separados, por lo cual se podían observar dos fases, una líquida- viscosa que era la gelatina y otra completamente sólida, que era el PF127.

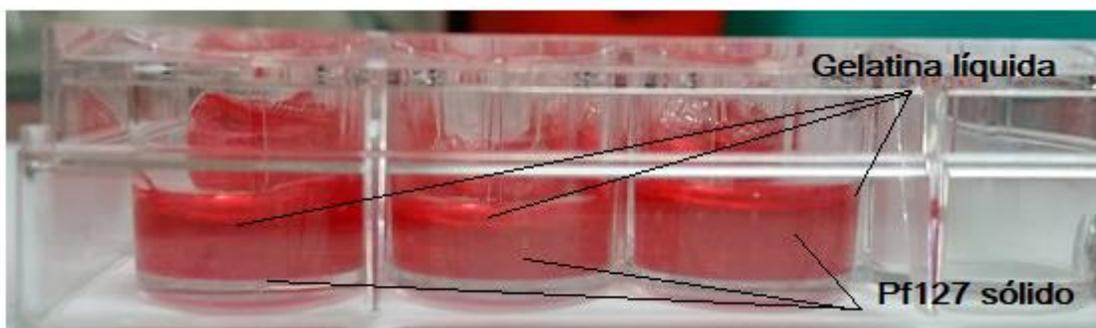


Figura 18. Hidrogel combinado de gelatina y PF127. El resultado de combinar ambos hidrogeles es una división de fases, mientras la gelatina queda líquida, el PF127 está solidificado, esto se invierte dependiendo la temperatura.

e. Ensayos de viabilidad celular.

En las pruebas de viabilidad se tuvieron algunos problemas, ya que probablemente por el tiempo que se tenían que dejar a las células en una temperatura baja, mientras se marcaban, había muy pocas células incluso en el control, ya que había una cantidad mínima de células adheridas a la caja de cultivo. Además, al ser un cultivo en 3D la captura de fotos se dificultó.

En el resultado visual de las pruebas con calceína (Fig. 19) podemos observar que en el tratamiento con gelatina (E) hay un número celular mayor, comparado con el resto de los tratamientos, sin embargo, en todos los tratamientos las células pierden la morfología alargada.

Por otro lado, tanto en el tratamiento con PF127 (I) y donde se combinan ambos hidrogeles (M), hay una disminución en el número de células que se observan.

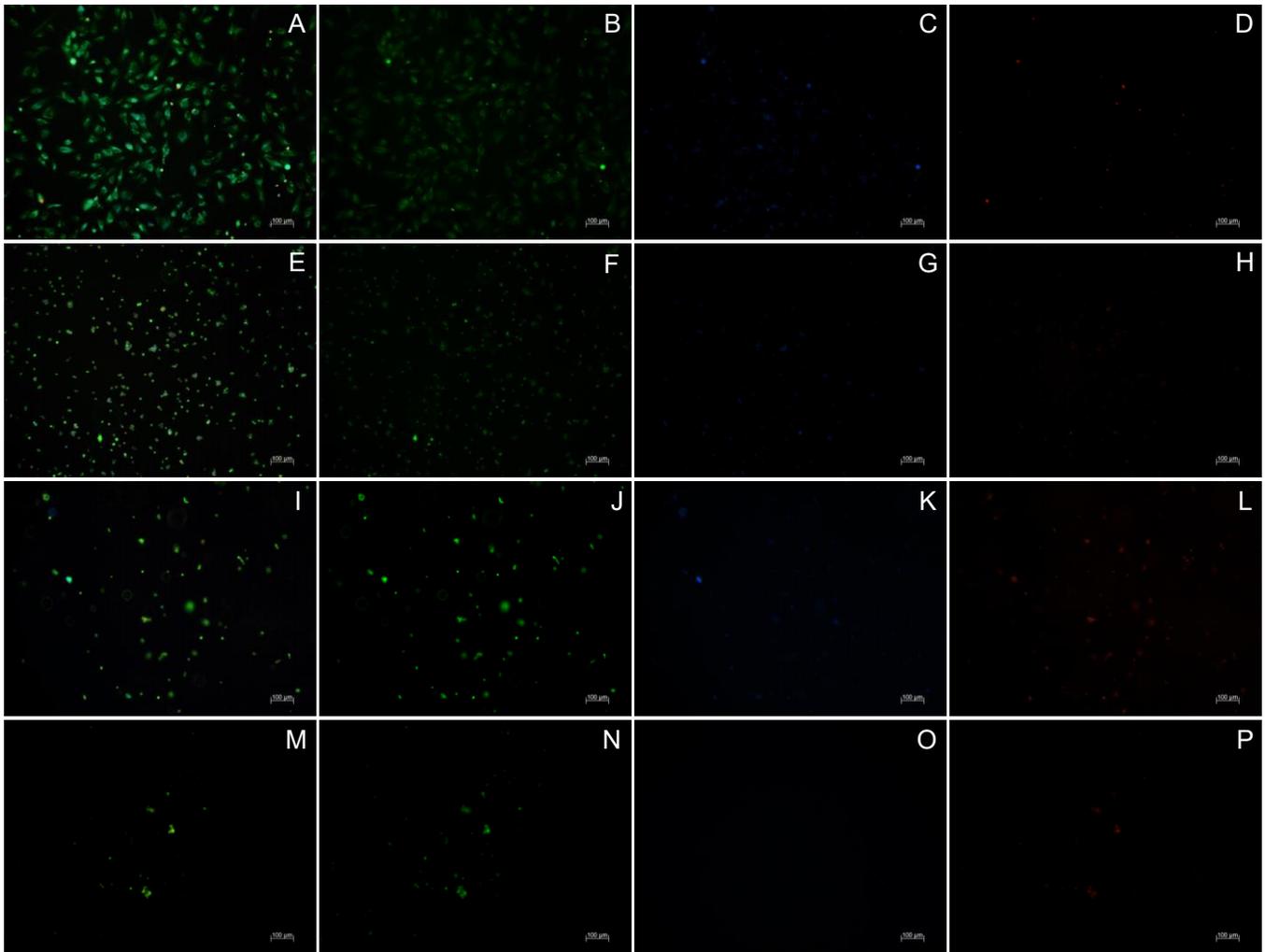
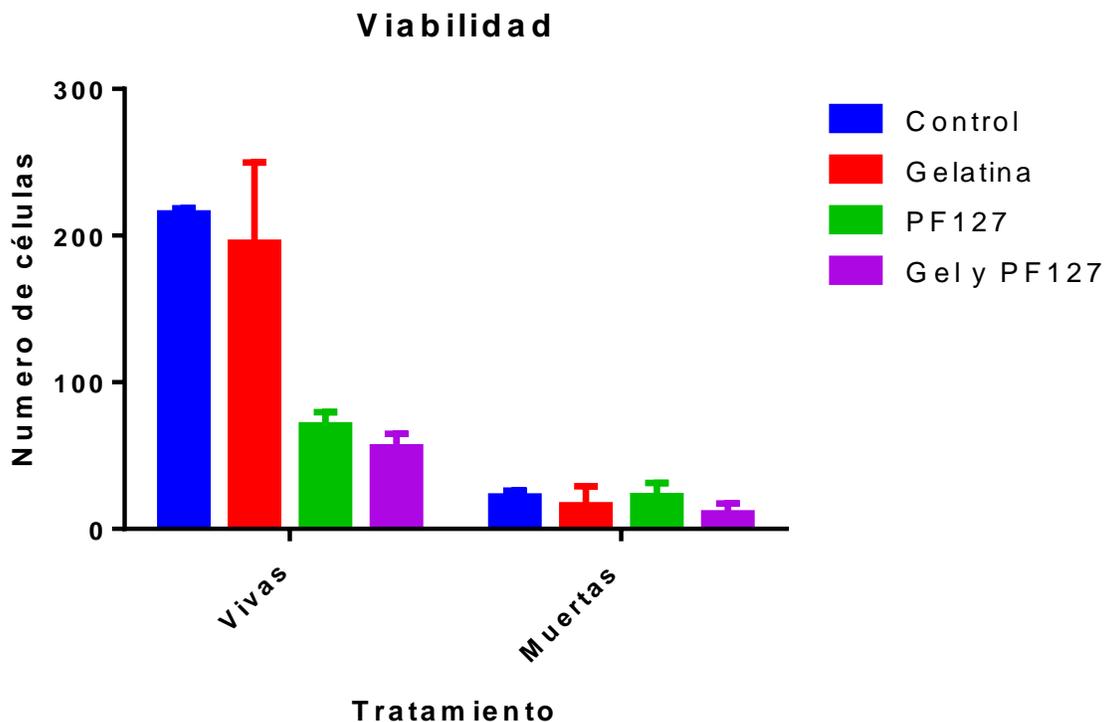


Figura 19. Resultados de pruebas de viabilidad de hidrogeles. En verde (B)(F)(J)(N) aparecen las células vivas, marcadas con calceína, en rojo (D)(H)(L)(P) las células muertas, marcadas con homodímero de etidio, y en azul (C)(G)(K)(O) se observan las células vivas, marcadas con cell tracker violet. En (A)(E)(I)(M) está la imagen combinada de los tres marcadores. En el control (A)(B)(C)(D) las células mantienen una morfología alargada, sin embargo en los tratamientos con gelatina (E)(F)(G)(H), PF127 (I)(J)(K)(L) y la combinación de ambos hidrogeles (M)(N)(O)(P) existe un cambio en la morfología, la cual es redonda. Así mismo en el tratamiento con combinación de hidrogeles se observa una disminución significativa del número celular.

El número de células vivas y muertas por cada tratamiento, para poder determinar que tratamiento es el que mantiene más células vivas se presenta en la tabla 11, así mismo se realizó una prueba de Anova de una vía los resultados se muestran en la gráfica 2.

Tratamiento	Células Vivas			Células muertas		
Control	210	213	222	24	14	28
Gelatina	158	124	303	6	0	42
PF127	54	85	73	16	40	11
Gelatina y PF127	47	46	74	0	9	23

Tabla 11. Número de células vivas y muertas. Se trazaron cuadrantes representativos de cada una de las repeticiones de los tratamientos y se realizó un conteo celular para determinar en qué tratamiento sobreviven más células.



Grafiá 2. Prueba de anova de una vía. Con una $n=24$ y p de $0:05$ se comparó la viabilidad de los tratamientos control, gelatina, Pluronic F127 y la combinación de ambos hidrogeles. El resultado arrojó que entre los tratamientos de gelatina y control no hay diferencia significativa, sin embargo la hay con el resto de los tratamientos.

XI. Discusión

a. Aislamiento y cultivo celular

Las células troncales mesenquimales las podemos encontrar en una gran variedad de tejidos, como lo son la médula ósea, el tejido adiposo, la pulpa dental entre otros. Recientemente se han identificado poblaciones de células troncales mesenquimales en el endometrio, aún más reciente ha sido el descubrimiento de estas células en la sangre menstrual (Gargett, Schwab, & Deane, 2016)

Esta nueva fuente de obtención de células troncales mesenquimales tiene múltiples ventajas sobre las demás.

La principal ventaja con respecto a todas las demás fuentes, es la poca o nula invasión que se tiene para su obtención, ya que para ello únicamente se requiere del uso de una copa menstrual, mientras que para el resto de las fuentes se requiere de una cirugía. (Gargett, Schwab, & Deane, 2016); Alcayaga Miranda et al., 2015; Zhang et al., 2013; Anisimova, Zemel'ko, et al, 2013; Mou et al., 2013)

Otra gran ventaja que se tiene de esta fuente, es el hecho de poder obtener células periódicamente, ya que cada 28 días, se podrían obtener células de cultivo primario, sin tener que llegar a una gran cantidad de pases celulares. En cuanto a terapia tendría la desventaja de solo poder proporcionar células autólogas a mujeres.

De lo observado en los resultados podemos resaltar algunos de ellos. El primero es que de una de las muestras se obtuvo un número de células notablemente menor al resto, esto probablemente se deba a que la donadora usa un DIU de cobre, esta suposición la inferimos ya que existen reportes sobre la citotoxicidad de estos dispositivos, así como la citotoxicidad de los iones de cobre. (Larsson, et al, 1993; Beltrán García et al., 2000; Grillo, Reigosa, & de Mele, 2010; Carrascosa et al., 2018)

Otro aspecto interesante que observamos en el comportamiento de las muestras es que si en nuestro conteo inicial existía un número elevado de células (mayor a 25000000) se aumentaba el riesgo de obtener un cultivo contaminado.

El problema de contaminación puede deberse a varios factores, el primero y que incluso se puede clasificar como una desventaja de la fuente de aislamiento de células troncales, es la naturaleza de la fuente, es decir, al tener que pasar por la vagina de las donantes aumenta el riesgo de contaminación bacteriana, esto debido a la presencia “normal” de microbiota. El gran número de células puede deberse en parte a la presencia de la microbiota, es decir, que algunas de estas células no sean células de las donantes sino sean células de la microbiota, las cuales si bien son más pequeñas, causarían “ruido” al momento de realizar el conteo celular. (van de Wijgert et al., 2014; Molenaar, Singer, & Ouburg, 2018; Moreno & Simon, 2018; Kroon, Ravel, & Huston, 2018)

Como se puede observar si bien existe una gran cantidad de células al inicio del cultivo primario estas se ven muy disminuidas al momento de hacer los lavados después de 24 horas. Esto es debido a que la población de células troncales es mínima en relación con todas las células que encontramos en la sangre menstrual, donde hay células del endometrio, eritrocitos, monocitos, granulocitos, entre otros, esto incluso después de la selección con Ficoll, ya que quedan algunos residuos. Una ventaja radica en que, de todas esas células, las únicas que tienen la característica de ser adherentes son las células troncales mesenquimales, y las células progenitoras de fibroblastos, por lo cual después de realizar los lavados solo quedan las células adherentes. (Meng et al., 2007; Musina, et al, 2008; Gargett, Schwab, & Deane, 2016)

Las células aisladas y adheridas tardaron entre 15 y 30 días en llegar a confluencia, sin embargo, este comportamiento únicamente se presentó en las células de cultivo primario, a partir del primer pase y hasta el pase 7 que se han llevado, las células tardan alrededor de 5 días en llegar a confluencia.

b. Caracterización inmunofenotípica de las eMSC por citometría de flujo.

Una de las características estandarizadas que se tienen para poder considerar que una población celular es de células troncales mesenquimales es la presencia de determinadas proteínas en la membrana celular; por lo cual estas se consideran marcadores, que diferencian entre tipos celulares; estos son el CD 73, CD 90 y el CD 105. A su vez las MSC deben ser negativas a CD 34 y CD45, esto debido a que estos últimos dos marcadores se presentan en las células troncales hematopoyéticas. (Dominici et al., 2006)

En los resultados encontramos que en efecto los marcadores CD90 y CD73 resultan positivos al realizar un promedio de los resultados de las muestras, es decir, tienen una presencia superior al 90% (Fig. 14), mientras que los marcadores de CD34 y CD45 son negativos, con una presencia de menos del 0.8%. El marcador CD105 se encuentra apenas en 23% de la población, así como se puede ver que el CD44 está presente en un 45%, estos resultados se pueden comparar con los de Darzi, Werkmeister, Deane, & Gargett del 2016, donde proponen que, para tener una población de células troncales más pura, se podrían hacer una selección de células con marcadores CD140b y CD146. En ese trabajo los porcentajes de los marcadores CD105, CD90 CD 73 y CD44 se ven aumentados al hacer la preselección de los marcadores perivasculares. Así mismo ellos proponen al CD44 como un marcador de células troncales derivadas del endometrio.

c. Análisis de la diferenciación osteogénica.

La parte de diferenciación se complicó un poco debido a que los anticuerpos secundarios presentaron aglomerados. Sin embargo, a pesar de ello se lograron tener resultados de manera indirecta, a partir de la morfología y los marcadores de las MSC en concreto al CD73. Para poder evitar la formación de estos aglomerados, se podría centrifugar el anticuerpo antes de aplicarlo.

Una de las características que podría estar indicando que las células se están diferenciando es en las fotos de campo claro que se muestran en la figura 15, especialmente en el inciso D, donde se observan células con un núcleo grande y con un aspecto piciforme, lo cual corresponde con la descripción de osteoblastos, las cuales son células de linaje óseo (Tortora, Derrickson, 2013; Fortoul, 2013; Ross & Pawlina; Gilbert, 2000; Provot, et al, 2013).

Por otro lado, en la figura 17, donde se muestra la imagen de la inmunofluorescencia del CD73, vemos que las células tratadas con el medio de diferenciación no presentan la marca del CD73, sin embargo, las células que se trataron con el medio control presentan en toda la membrana la señal del marcador indicando que las células se están diferenciando ya que este marcador es positivo y característico para las eMSC (Meng et al., 2007; Schwab & Gargett, 2007; Gargett, Schwab, & Deane, 2016; Verdi, et al, 2014; Ghobadi, Mehrabani, & Mehrabani, 2015; Rodrigues et al., 2016; Mehrabani et al, 2016; Du, et al, 2016; Faramarzi et al, 2016;) Sin embargo esto no quiere decir que sí se están diferenciando a un linaje óseo, solo nos dice que las células que tenemos en el cultivo de diferenciación ya no son eMSC.

Finalmente tenemos las inmunofluorescencias que se vieron afectadas por el estado del anticuerpo secundario, éstas son las del factor de transcripción RUNX2 y la proteína osteocalcina. Estas serían la evidencia más clara y directa de que las eMSC se diferenciaron a un linaje óseo, ya que el RUNX2 se presentaría en los núcleos de los osteoblastos y la osteocalcina en la matriz excretada (Gilbert, 2000; Provot, et al, 2013; Bruderer, et al, 2014; Komori, 2018; Xu, et al, 2015).

Sin embargo, debido a que se tienen presencia de cristales, para poder hacer visibles las señales del RUNX2 y de la osteocalcina, se incrementó el tiempo de exposición, haciendo que el fondo se viera un poco verde, sin embargo, en ambos casos es posible apreciar resultados favorables.

En la figura 16 se ven los resultados de la osteocalcina. Las células control solo podemos apreciar los núcleos azules teñidos con DAPI y algunos cristales del fluoróforo, en cambio en las células diferenciadas, a pesar de estar oscura la foto y

la presencia de algunos cristales, la proteína se aprecia alrededor de los núcleos azules marcados con DAPI, lo cual concuerda con la localización de la proteína, la cual se encuentra en la matriz extracelular secretada por los osteoblastos (Gilbert, 2000; Provot, et al, 2013).

Así mismo en la imagen 17 se observan los resultados para la inmunofluorescencia con RUNX2, en las células control solo se aprecian algunos cristales de tamaño considerable del fluoroforo y los nucleos teñidos con DAPI. Por su parte las células diferenciadas muestran, además de cristales, una señal en el citoplasma, así como en algunos casos una colocalización de la señal de RUNX2 (verde), con la del núcleo (DAPI), por lo que podemos pensar que sí hay presencia de RUNX2 en las células diferenciadas, lo cual diría que sí se han diferenciado en un linaje óseo. (Bruderer, et al, 2014; Komori, 2018; Xu, et al, 2015). La presencia de señal de RUNX2 (Verde) en el citoplasma de las células es algo que no debería de suceder, ya que el RUNX2 al ser un factor de transcripción únicamente debería de estar presente en el núcleo (Gilbert, 2000; Bruderer, et al, 2014; Komori, 2018) y no se debe a pegado inespecífico del anticuerpo primario ya que no pasa lo mismo en las células control y no puede ser por pegado inespecífico del anticuerpo secundario debido a que en el control negativo, donde solo se colocó anticuerpo secundario, solo se observan cristales, por lo que esta señal podría deberse a la sobreexposición a la luz.

d. Desarrollo de los hidrogeles.

En cuanto al desarrollo de andamios, se pudo trabajar con los dos tipos de materiales disponibles, uno natural (gelatina) y el otro sintético (Pluronic F127), sin embargo, ambos entran entre los hidrogeles reversibles, la diferencia entre ellos y por qué se decidió trabajar con ambos, es que uno pertenece a los materiales UCGT (plutonic F127) y por otro lado los materiales LCGT (gelatina).

El trabajo con el Pluronic F127 daba ciertas ventajas, ya que a pesar de dificultarse el enfriarlo y diluirlo, su manejo era más fácil ya que tardaba un poco más en gelificar y al estar en incubación con las células tenía su estado gelificado. Sin embargo,

tenía la desventaja de propiciar un choque térmico a las células ya que el hidro gel tenía que estar a temperaturas menores a 4 ° C.

Por otro lado, la gelatina se dificultaba su trabajo ya que al estar a temperatura ambiente no tardaba mucho en gelificar, por lo cual se complicaba su manipulación, además de que, al incubarse con las células, regresaba a su estado líquido. La ventaja de este hidrogel es que permite mantener una temperatura contante para las células

Finalmente, el tratar de combinar ambos hidrogeles se hacía difícil, ya que, al tratar de combinarlos, debido a sus diferentes características la temperatura de uno gelificaba al otro y viceversa, lo cual también daba un choque térmico a las células, sin embargo, el hidrogel que se generó al combinar la gelatina y el Pluronic F127 tenía la ventaja de siempre tener una fase gelificada.

e. Ensayos de viabilidad celular.

En los ensayos de viabilidad celular se presentan resultados interesantes, como ya se mencionó antes en la parte visual se observa que todos los tratamientos, incluido el control, las células pierden su morfología habitual fibroblastoide, sin embargo, al verse este comportamiento en el control y los tratamientos, se piensa que no son los hidrogeles los causantes de estas deformaciones, por lo cual la posible explicación pueden ser dos factores por los cuales pasaron todas las células. El primero es el tiempo que estuvieron en suspensión, esto mientras se realizó el marcaje con Cell Tracker. El segundo es que para poder manipular el PF127 se mantuvo la placa de cultivo a una temperatura baja, lo cual también puede afectar a las células.

Dejando atrás la poca cantidad de células encontradas, seguimos al análisis de viabilidad, para lo cual se realizó una Anova de una vía, comparando la cantidad de células muertas y vivas entre cada tratamiento. En los resultados observamos que no hay diferencia significativa entre el control y el tratamiento de gelatina, sin

embargo, sí la hay entre el control y el tratamiento de PF127 y el de los hidrogeles combinados, ya que en estos últimos hay menos células.

Con estos resultados podemos ver que los resultados de la gelatina coinciden con lo reportado en otros trabajos, donde se observa que de la gelatina es una excelente matriz para las células, como se mencionó anteriormente, gracias a la presencia de los grupos funcionales de la colágena, que permiten la adhesión de las células (Obara et al., 2016; Oryan, Alidadi, Bigham-Sadegh, Moshiri, & Kamali, 2017; Kim et al., 2017).

Así mismo podemos decir que los resultados para el hidrogel de PF127 no son los mejores, si bien corresponde con lo que hay reportado sobre este material, en el sentido de no ser tóxico y que afecte la viabilidad celular (Khattak, Bhatia, & Roberts, 2005; Park et al., 2009; Yap & Yang, 2016) no es un material óptimo debido a que al tener que manipularse en temperaturas bajas, no permite que las células mantengan su morfología, al menos no durante las primeras 24 horas post cultivo.

Finalmente, en el hidrogel combinado de PF127 y de gelatina observamos que es el que tiene menor viabilidad de todos, lo cual no coincide con los estudios en los cuales al combinar la gelatina con otros materiales (Takahashi, et al, 2005; Hussain et al, 2012; Ratanavaraporn, et al, 2011), ya que en éstos se mantiene la característica de permitir una buena viabilidad. Sin embargo, la explicación que se le da a que con el PF127 no permita la viabilidad y que incluso sea menor que en el tratamiento donde el hidrogel es solo de Pf127, es que al tener que manipular la gelatina a una temperatura alta (mayor a 40°C) y el PF127 a una temperatura baja (menor a 4°C) se provocó un choque térmico.

XII. Conclusión

Las eMSC, son una excelente fuente celular para investigación ya que, al poder obtenerse de la sangre menstrual, son células que pueden obtenerse de una manera no invasiva, ya que no se requiere de cirugías, únicamente se necesitaría el uso de la copa menstrual, además de poder obtenerlas continuamente, cada ciclo menstrual. Así mismo estas células tienen una muy buena capacidad de proliferación. También es importante destacar la capacidad de diferenciación que tienen estas células.

En cuanto a los hidrogeles podemos decir que el hidrogel de gelatina es la mejor opción para el cultivo de estas células, ya que es el que permite una mayor viabilidad celular, además de que su manipulación no es tan complicada como la del PF127.

XIII. Perspectivas

Perspectivas para este trabajo hay muchas, a corto, a mediano y a largo plazo, las más inmediatas serían estandarizar la marca de la copa menstrual a usar, así como la cantidad de fluido a procesar.

A mediano plazo se podrían utilizar los marcadores CD140b y CD146 para poder obtener con mayor pureza a las eMSC, esto se debería de hacer con un cell sorting. Así como hacer la diferenciación a linaje óseo de nuevo, utilizando nuevos anticuerpos secundarios para la inmunofluorescencia o bien se podría realizar una inmunohistoquímica para confirmar el potencial de diferenciación de estas células.

En cuanto a los hidrogeles se esperaría analizar sus características físico-químicas tales como micro-morfología, presencia de grupos funcionales, carácter hidrofílico/hidrofóbico, propiedades térmicas y propiedades mecánicas por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja (FTIR), ángulo de contacto, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y ensayos de compresión uniaxial.

Finalmente, a largo plazo podría seguirse la investigación para generar nuevas terapias para las lesiones óseas. Esto ya que tienen un gran potencial de diferenciación a tejido óseo, podrían embeberse en un hidrogel e implementarse directamente en las lesiones.

XIV. Anexos

a. Tríptico de convocatoria de donación



LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA
Laboratorio de Biotecnología
2017 “Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos”

Aislamiento y caracterización de células troncales (células madre) del endometrio

En este proyecto se aislarán y caracterizarán las células troncales (células madre) del endometrio (recubrimiento del útero). Estas células tienen un gran potencial terapéutico por lo que podrían ayudar a generar nuevas terapias de ingeniería de tejidos.

Las células troncales de endometrio están presentes en la sangre menstrual, por lo cual se requieren mujeres que quieran donar muestras de su menstruación para continuar con la investigación y su posterior aplicación.

Puedes ser parte de esta investigación que se está realizando en el INR, con la donación de muestra o muestras de sangre menstrual.

Solo necesitas estar en un rango de edad de entre 18 y 28 años, usar copa menstrual, no tener enfermedades de transmisión sexual y que la donación sea completamente voluntaria. Además de llenar un cuestionario y firmar una carta de consentimiento informado.

Si te interesa formar parte de este proyecto puedes ponerte en contacto con el Dr. Roberto Sánchez o el estudiante Alan Valencia.

Teléfonos de contacto:

Dr. Roberto Sánchez: 5516867153
sanchez2.roberto@gmail.com

Estudiante Alan E. Valencia Amaya: 5549357197
valenciamaya@ciencias.unam.mx
Instituto Nacional de Rehabilitación, CENIAQ.
Departamento de Biotecnología. Tel. 5999-1000 ext. 14904



Hospital Certificado:
Consejo de Salubridad General
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica
Centro Colaborador de la OPS/OMIS para la Investigación y Rehabilitación Médica
2011-2015



Certificado ROC-015-15
ISO 9001:2008
2015-2018

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F

c. Carta de consentimiento informado firmado por donadoras



Instituto Nacional
de Rehabilitación

LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA

Laboratorio de Biotecnología
2017 "Año del Centenario de la Promulgación de la
Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Folio: _____

Carta de consentimiento informado.

A quien corresponda:

Por este medio informo a usted, que se está llevando a cabo el proyecto de investigación "**Aislamiento y caracterización de células troncales mesenquimales derivadas del endometrio con potencial terapéutico**" dentro del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Dicha investigación tiene como objetivo principal aislar y caracterizar células troncales mesenquimales "células madre", las cuales puedan ser utilizadas en un futuro para realizar terapias alternativas para los pacientes que sufren quemaduras. Por tal motivo pedimos su consentimiento para utilizar las muestras de sangre menstrual, la cual usted debe donar de forma voluntaria. Así mismo hacemos de su conocimiento que la muestra que no sea utilizada será tratada como desecho biológico. Los datos proporcionados serán totalmente confidenciales.

Fecha: _____

Nombre de la participante: _____ Firma: _____

Teléfono: _____

Correo electrónico: _____

Testigo: _____

Testigo: _____

Investigador responsable:

Doctor Roberto Sánchez Sánchez

Teléfonos de contacto:

Dr. Roberto Sánchez: 5516867153

Estudiante Alan E. Valencia Amaya: 5549357197

Instituto Nacional de Rehabilitación, CENIAQ. Laboratorio de Biotecnología. Tel. 5999-1000 ext. 14901



Hospital Certificado:
Consejo de Salubridad General
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica
Centro Colaborador de la OPS/OMS para
la Investigación y Rehabilitación Médica
2011-2015



Certificado ROC-015-15
ISO 9001:2008
2015-2018

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F

XV. Referencias

- Abarrategi, A., Moreno-Vicente, C., Martínez-Vázquez, F. J., Civantos, A., Ramos, V., Sanz-Casado, J. V., ... López-Lacomba, J. L. (2012). Biological Properties of Solid Free Form Designed Ceramic Scaffolds with BMP-2: In Vitro and In Vivo Evaluation. *PLOS ONE*, 7(3), e34117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034117>
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Luz-Crawford, P., Aguila-Díaz, C., Fernandez, A., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2015). Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, 32. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0013-5>
- Allickson, J. G., Sanchez, A., Yefimenko, N., Borlongan, C. V., & Sanberg, P. R. (2011). Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *The Open Stem Cell Journal*, 3(2011), 4–10. <https://doi.org/10.2174/1876893801103010004>
- Anisimova, S. V., Zemel'ko, V. I., Grinchuk, T. M., & Nikol'skiĭ, N. N. (2013). [Menstrual blood stem cells as a potential substrate of cell therapy]. *Tsitologija*, 55(1), 5–10.
- Atala, A. (2004). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Concepts for Clinical Application. *Rejuvenation Research*, 7(1), 15–31. <https://doi.org/10.1089/154916804323105053>
- Aubin, J. E. (2008). Chapter 4 - Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. En J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology (Third Edition)* (pp. 85–107). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00026-4>
- Beltran-Garcia, M. J., Espinosa, A., Herrera, N., Perez-Zapata, A. J., Beltran-Garcia, C., & Ogura, T. (2000). Formation of copper oxychloride and reactive oxygen species as causes of uterine injury during copper oxidation of Cu-IUD. *Contraception*, 61(2), 99–103.

- Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *European Cells & Materials*, 28, 269–286.
- Cabrera, A. G., Durán, M. Á. S., & Asención, J. P. M. (2013). Osteogénesis imperfecta tipo II: Reporte de un caso con una supervivencia mayor a cuatro meses. *Revista Mexicana de Ortopedia Pediátrica*, 15(2), 111–117.
- Carletti, E., Motta, A., & Migliaresi, C. (2011). Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 695, 17–39. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2
- Carrascosa, J. P., Cotán, D., Jurado, I., Oropesa-Ávila, M., Sánchez-Martín, P., Savaris, R. F., ... Horcajadas, J. A. (2018). The Effect of Copper on Endometrial Receptivity and Induction of Apoptosis on Decidualized Human Endometrial Stromal Cells. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 25(7), 985–999. <https://doi.org/10.1177/1933719117732165>
- Cervelló, I., Gil-Sanchis, C., Mas, A., Delgado-Rosas, F., Martínez-Conejero, J. A., Galán, A., ... Simón, C. (2010). Human Endometrial Side Population Cells Exhibit Genotypic, Phenotypic and Functional Features of Somatic Stem Cells. *PLOS ONE*, 5(6), e10964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010964>
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(Suppl 4), 467–479. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>
- ChanRW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 2004;70:1738–1750.
- Chen, J.-Y., Mou, X.-Z., Du, X.-C., & Xiang, C. (2015). Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(9), 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.07.022>

- Chen, W.-J., Huang, J.-W., Niu, C.-C., Chen, L.-H., Yuan, L.-J., Lai, P.-L., ... Lin, S.-S. (2009). Use of fluorescence labeled mesenchymal stem cells in pluronic F127 and porous hydroxyapatite as a bone substitute for posterolateral spinal fusion. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(12), 1631–1636. <https://doi.org/10.1002/jor.20925>
- Darzi, S., Werkmeister, J. A., Deane, J. A., & Gargett, C. E. (2016). Identification and Characterization of Human Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Potential for Cellular Therapy. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(9), 1127–1132. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0190>
- Darzi, S., Zarnani, A. H., Jeddi-Tehrani, M., Entezami, K., Mirzadegan, E., Akhondi, M. M., ... Kazemnejad, S. (2012). Osteogenic differentiation of stem cells derived from menstrual blood versus bone marrow in the presence of human platelet releasate. *Tissue Engineering. Part A*, 18(15–16), 1720–1728. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0386>
- De Carvalho Rodrigues, D., Asensi, K. D., Vairo, L., Azevedo-Pereira, R. L., Silva, R., Rondinelli, E., ... Urményi, T. P. (2012). Human menstrual blood-derived mesenchymal cells as a cell source of rapid and efficient nuclear reprogramming. *Cell Transplantation*, 21(10), 2215–2224. <https://doi.org/10.3727/096368912X653048>
- Diniz, I. M. A., Chen, C., Xu, X., Ansari, S., Zadeh, H. H., Marques, M. M., ... Moshaverinia, A. (2015). Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 26(3). <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5493-4>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Du, M., Chen, B., Meng, Q., Liu, S., Zheng, X., Zhang, C., ... Dai, J. (2015). 3D bioprinting

of BMSC-laden methacrylamide gelatin scaffolds with CBD-BMP2-collagen microfibers. *Biofabrication*, 7(4), 044104. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/044104>

Du, X., Yuan, Q., Qu, Y., Zhou, Y., & Bei, J. (2016). Endometrial Mesenchymal Stem Cells Isolated from Menstrual Blood by Adherence. *Stem Cells International*, 2016, 3573846. <https://doi.org/10.1155/2016/3573846>

Eaves, C. J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 125(17), 2605–2613. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>

Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156.

Faramarzi, H., Mehrabani, D., Fard, M., Akhavan, M., Zare, S., Bakhshalizadeh, S., ... Shirazi, R. (2016). The Potential of Menstrual Blood-Derived Stem Cells in Differentiation to Epidermal Lineage: A Preliminary Report. *World Journal of Plastic Surgery*, 5(1), 26–31.

Figueira, P. G. M., Abrão, M. S., Krikun, G., & Taylor, H. (2011). Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1221(1), 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05969.x>

Flores-Figueroa, E., Montesinos, J. J., & Mayani, H. (2006). Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de investigación clínica*, 58(5), 498–511.

Fortoul van der Goes, Teresa I. (2013). *Histología y biología celular (2a. ed.)*. McGraw Hill México.

García, M. del P. D., Hernández, M., Israel, S., Ramírez Pérez, E., Arias, D. D. C., Bastida, M. de los Á. S., ... Riverón, F. B. (2013). Características epidemiológicas de pacientes adultos atendidos por fracturas en el Instituto Nacional de Rehabilitación.

Investigación en Discapacidad, 2(2), 51–54.

Gargett, C. E., Schwab, K. E., & Deane, J. A. (2016). Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Human Reproduction Update*, 22(2), 137–163. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv051>

Gelatin from bovine skin G9391. (s/f). Recuperado el 24 de marzo de 2018, a partir de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g9391>

Ghobadi, F., Mehrabani, D., & Mehrabani, G. (2015). Regenerative Potential of Endometrial Stem Cells: A Mini Review. *World Journal of Plastic Surgery*, 4(1), 3–8.

Gilbert, S. F. (2000). Osteogenesis: The Development of Bones. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10056/>

Gioffredi, E., Boffito, M., Calzone, S., Giannitelli, S. M., Rainer, A., Trombetta, M., ... Chiono, V. (2016). Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications. *Procedia CIRP*, 49, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2015.11.001>

Grillo, C. A., Reigosa, M. A., & de Mele, M. A. F. L. (2010). Does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells? *Contraception*, 81(4), 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2009.12.003>

Haider, A., Gupta, K. C., & Kang, I.-K. (2014). PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration. *Nanoscale Research Letters*, 9, 314. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-314>

Hafidz RM, Yaakob CM, Amin I, Noorfaizan A (2011) Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal* 18: 787-791.

Hall, B. K. (2015). Chapter 2 - Bone. En *Bones and Cartilage (Second Edition)* (pp. 17–42). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416678-3.00002-1>

- Hoffman, A. S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00239-3)
- Hollinger, J. O., Einhorn, T. A., Doll, B., & Sfeir, C. (Eds.). (2004). *Bone Tissue Engineering* (1 edition). Boca Raton: CRC Press.
- Huang, J.-W., Chen, W.-J., Liao, S.-K., Yang, C.-Y., Lin, S.-S., & Wu, C.-C. (2006). Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in A carrier system of Pluronic F127 and Interpore. *Chang Gung Medical Journal*, 29(4), 363–372.
- Hussain, A., Bessho, K., Takahashi, K., & Tabata, Y. (2012). Magnesium calcium phosphate as a novel component enhances mechanical/physical properties of gelatin scaffold and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part A*, 18(7–8), 768–774. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0310>
- Karadas, O., Yucel, D., Kenar, H., Torun Kose, G., & Hasirci, V. (2014). Collagen scaffolds with in situ-grown calcium phosphate for osteogenic differentiation of Wharton's jelly and menstrual blood stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(7), 534–545. <https://doi.org/10.1002/term.1555>
- Karaplis, A. C. (2008). Chapter 3 - Embryonic Development of Bone and Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation. En J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & T. J. Martin (Eds.), *Principles of Bone Biology (Third Edition)* (pp. 53–84). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00025-2>
- Kazemnejad, S., Akhondi, M.-M., Soleimani, M., Zarnani, A. H., Khanmohammadi, M., Darzi, S., & Alimoghadam, K. (2012). Characterization and chondrogenic differentiation of menstrual blood-derived stem cells on a nanofibrous scaffold. *The International Journal of Artificial Organs*, 35(1), 55–66. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000019>
- Keothongkham, K., Charoenphandhu, N., Thongbunchoo, J., Suntornsaratoon, P.,

Krishnamra, N., Tang, I.-M., & Pon-On, W. (2017). Evaluation of bioactive glass incorporated poly(caprolactone)-poly(vinyl alcohol) matrix and the effect of BMP-2 modification. *Materials Science and Engineering: C*, 74, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.128>

Khanmohammadi, M., Khanjani, S., Edalatkhah, H., Zarnani, A. H., Heidari-Vala, H., Soleimani, M., ... Kazemnejad, S. (2014). Modified protocol for improvement of differentiation potential of menstrual blood-derived stem cells into adipogenic lineage. *Cell Proliferation*, 47(6), 615–623. <https://doi.org/10.1111/cpr.12133>

Khanmohammadi, Manijeh, Khanjani, S., Bakhtyari, M. S., Zarnani, A. H., Edalatkhah, H., Akhondi, M. M., ... Kazemnejad, S. (2012). Proliferation and chondrogenic differentiation potential of menstrual blood- and bone marrow-derived stem cells in two-dimensional culture. *International Journal of Hematology*, 95(5), 484–493. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1067-0>

Khattak, S. F., Bhatia, S. R., & Roberts, S. C. (2005). Pluronic F127 as a Cell Encapsulation Material: Utilization of Membrane-Stabilizing Agents. *Tissue Engineering*, 11(5–6), 974–983. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.974>

Khoury, M., Alcayaga-Miranda, F., Illanes, S. E., & Figueroa, F. E. (2014). The promising potential of menstrual stem cells for antenatal diagnosis and cell therapy. *Frontiers in Immunology*, 5, 205. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00205>

Kim, A. Y., Kim, Y., Lee, S. H., Yoon, Y., Kim, W.-H., & Kweon, O.-K. (2017). Effect of Gelatin on Osteogenic Cell Sheet Formation Using Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*, 26(1), 115–123. <https://doi.org/10.3727/096368916X693338>

Komori, T. (2018). Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochemistry and Cell Biology*, 149(4), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1640-6>

Kroman, A. M., & Symes, S. A. (2013). Chapter 8 - Investigation of Skeletal Trauma. En E.

A. DiGangi & M. K. Moore (Eds.), *Research Methods in Human Skeletal Biology* (pp. 219–239). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385189-5.00008-X>

Kroon, S. J., Ravel, J., & Huston, W. M. (2018). Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertility and Sterility*, 110(3), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.036>

Lai, D., Guo, Y., Zhang, Q., Chen, Y., & Xiang, C. (2016). Differentiation of human menstrual blood-derived endometrial mesenchymal stem cells into oocyte-like cells. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 48(11), 998–1005. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw090>

Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>

Larsson, G., Milsom, I., Jonasson, K., Lindstedt, G., & Rybo, G. (1993). The long-term effects of copper surface area on menstrual blood loss and iron status in women fitted with an IUD. *Contraception*, 48(5), 471–480.

Lee, B. H., Lum, N., Seow, L. Y., Lim, P. Q., & Tan, L. P. (2016). Synthesis and Characterization of Types A and B Gelatin Methacryloyl for Bioink Applications. *Materials*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/ma9100797>

Lee, J. H., Baek, H.-R., Lee, K. M., Lee, H.-K., Im, S. B., Kim, Y. S., ... Lee, C.-K. (2014). The Effect of Poloxamer 407-Based Hydrogel on the Osteoinductivity of Demineralized Bone Matrix. *Clinics in Orthopedic Surgery*, 6(4), 455–461. <https://doi.org/10.4055/cios.2014.6.4.455>

Leroy, A., Nottelet, B., Bony, C., Pinese, C., Charlot, B., Garric, X., ... Coudane, J. (2015). PLA-ploxamer/ploxamine copolymers for ligament tissue engineering: sound macromolecular design for degradable scaffolds and MSC differentiation. *Biomaterials Science*, 3(4), 617–626. <https://doi.org/10.1039/c4bm00433g>

Li, J., Wang, Q., Gu, Y., Zhu, Y., Chen, L., & Chen, Y. (2017). Production of Composite

Scaffold Containing Silk Fibroin, Chitosan, and Gelatin for 3D Cell Culture and Bone Tissue Regeneration. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 23, 5311–5320.

Li, S, Chow, T., & Chu, J. (2017). Engineering microdent structures of bone implant surfaces to enhance osteogenic activity in MSCs. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.11.016>

Lindsay R, Cosman F.(2012) Chapter 354- Osteoporosis. En Longo, D. L., & Kasper, D. L. Harrison. Principios de Medicina Interna (17ª ed) (pp. 2397-2408.) Madrid: McGraw-Hill.

Long, F., & Ornitz, D. M. (2013). Development of the Endochondral Skeleton. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008334>

Lovato-Salas, F., Luna-Pizarro, D., Oliva-Ramírez, S. A., Flores-Lujano, J., & Núñez-Enríquez, J. C. (2015). Prevalencia de fracturas de cadera, fémur y rodilla en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Traumatología y Ortopedia “Lomas Verdes” del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Acta ortopédica mexicana*, 29(1), 13–20.

Maji, K., Dasgupta, S., Pramanik, K., & Bissoyi, A. (2016). Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2016/9825659>

Masuda, H., Matsuzaki, Y., Hiratsu, E., Ono, M., Nagashima, T., Kajitani, T., ... Okano, H. (2010). Stem Cell-Like Properties of the Endometrial Side Population: Implication in Endometrial Regeneration. *PLOS ONE*, 5(4), e10387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010387>

Masuda, H., Anwar, S. S., Bühring, H.-J., Rao, J. R., & Gargett, C. E. (2012). A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplantation*, 21(10), 2201–2214. <https://doi.org/10.3727/096368911X637362>

- Mehrabani, D., Nazarabadi, R. B., Kasraeian, M., Tamadon, A., Dianatpour, M., Vahdati, A., ... Ghobadi, F. (2016). Growth Kinetics, Characterization, and Plasticity of Human Menstrual Blood Stem Cells. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 41(2), 132–139.
- Meng, X., Ichim, T. E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., ... Riordan, N. H. (2007). Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5, 57. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>
- Molenaar, M. C., Singer, M., & Ouburg, S. (2018). The two-sided role of the vaginal microbiome in Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium pathogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, 130, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.08.006>
- Moreno, I., & Simon, C. (2018). Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertility and Sterility*, 110(3), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.041>
- Mou, X., Lin, J., Chen, J., Li, Y., Wu, X., Xiang, B., ... Xiang, C. (2013). Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 14(11), 961–972. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1300081>
- Musina, R. A., Belyavski, A. V., Tarusova, O. V., Solovyova, E. V., & Sukhikh, G. T. (2008). Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 145(4), 539–543. <https://doi.org/10.1007/s10517-008-0136-0>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Park, K. M., Lee, S. Y., Joung, Y. K., Na, J. S., Lee, M. C., & Park, K. D. (2009). Thermosensitive chitosan–Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*, 5(6), 1956–1965.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.040>

Percival, C. J., & Richtsmeier, J. T. (2013a). Angiogenesis and Intramembranous Osteogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 242(8), 909–922. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23992>

Provot, S., Schipani, E., Wu, J. Y., & Kronenberg, H. (2013). Chapter 6 - Development of the Skeleton. En R. Marcus, D. Feldman, D. W. Dempster, M. Luckey, & J. A. Cauley (Eds.), *Osteoporosis (Fourth Edition)* (pp. 97–126). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00006-6>

Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Kanokpanont, S., Yamamoto, M., & Tabata, Y. (2011). Osteogenic differentiation of bone-marrow-derived stem cells cultured with mixed gelatin and chitooligosaccharide scaffolds. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 22(8), 1083–1098. <https://doi.org/10.1163/092050610X499050>

Ren, H., Sang, Y., Zhang, F., Liu, Z., Qi, N., & Chen, Y. (2016). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2016, 3516574. <https://doi.org/10.1155/2016/3516574>

Reza-Albarrán, A. A. (2016). [Osteoporosis]. *Gaceta Medica De Mexico*, 152 Suppl 1, 84–89.

Rodrigues, M. C. O., Lippert, T., Nguyen, H., Kaelber, S., Sanberg, P. R., & Borlongan, C. V. (2016). Menstrual Blood-Derived Stem Cells: In Vitro and In Vivo Characterization of Functional Effects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 951, 111–121. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_9

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2013). *Histología: texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Medica Panamericana SA de CV.

Rossignoli, F., Caselli, A., Grisendi, G., Piccinno, S., Burns, J. S., Murgia, A., ... Dominici, M. (2013). Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual

tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *BioMed Research International*, 2013, 901821. <https://doi.org/10.1155/2013/901821>

Ruck, J., Dahan-Oliel, N., Montpetit, K., Rauch, F., & Fassier, F. (2011). Fassier–Duval femoral rodding in children with osteogenesis imperfecta receiving bisphosphonates: functional outcomes at one year. *Journal of Children’s Orthopaedics*, 5(3), 217–224. <https://doi.org/10.1007/s11832-011-0341-7>

Santos, T. S., Abuna, R. P. F., Castro Raucci, L. M. S., Teixeira, L. N., de Oliveira, P. T., Beloti, M. M., & Rosa, A. L. (2015). Mesenchymal Stem Cells Repress Osteoblast Differentiation Under Osteogenic-Inducing Conditions. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(12), 2896–2902. <https://doi.org/10.1002/jcb.25237>

Schwab, K. E., & Gargett, C. E. (2007). Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction*, 22(11), 2903–2911. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem265>

Silva Dos Santos, D., Coelho de Oliveira, V. C., Asensi, K. D., Vairo, L., Carvalho, A. B., Campos de Carvalho, A. C., & Goldenberg, R. C. D. S. (2014). Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells as New Human Feeder Layer System for Human Embryonic Stem Cells. *Cell Medicine*, 7(1), 25–35. <https://doi.org/10.3727/215517914X679265>

Sobczak-Kupiec, A., Malina, D., Piatkowski, M., Krupa-Zuczek, K., Wzorek, Z., & Tyliczszak, B. (2012). Physicochemical and biological properties of hydrogel/gelatin/hydroxyapatite PAA/G/HAp/AgNPs composites modified with silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(12), 9302–9311.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Takahashi, Y., Yamamoto, M., & Tabata, Y. (2005). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -

tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 26(17), 3587–3596.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.046>

Tortora, G. J., Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología / Principles of Anatomy and Physiology: Incluye Sitio Web*. Editorial Medica Panamericana SA de CV

Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2).
<https://doi.org/10.1042/BSR20150025>

Ulrich, D., Muralitharan, R., & Gargett, C. E. (2013). Toward the use of endometrial and menstrual blood mesenchymal stem cells for cell-based therapies. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(10), 1387–1400.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2013.826187>

van de Wijgert, J. H. H. M., Borgdorff, H., Verhelst, R., Crucitti, T., Francis, S., Verstraelen, H., & Jaspers, V. (2014). The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PloS One*, 9(8), e105998.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105998>

Vashi, A. V., Keramidaris, E., Abberton, K. M., Morrison, W. A., Wilson, J. L., O'Connor, A. J., ... Thompson, E. W. (2008). Adipose differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using Pluronic F-127 hydrogel in vitro. *Biomaterials*, 29(5), 573–579. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.017>

Vassena, R., Eguizabal, C., Heindryckx, B., Sermon, K., Simon, C., van Pelt, A. M. M., ... ESHRE special interest group Stem Cells. (2015). Stem cells in reproductive medicine: ready for the patient? *Human Reproduction (Oxford, England)*, 30(9), 2014–2021. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev181>

Verdi, J., Tan, A., Shoaee-Hassani, A., & Seifalian, A. M. (2014). Endometrial stem cells in regenerative medicine. *Journal of Biological Engineering*, 8, 20.
<https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-20>

- Wang, J., Wang, C. D., Zhang, N., Tong, W. X., Zhang, Y. F., Shan, S. Z., ... Li, Q. F. (2016). Mechanical stimulation orchestrates the osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells by regulating HDAC1. *Cell Death & Disease*, 7(5), e2221. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.112>
- Xu, J., Li, Z., Hou, Y., & Fang, W. (2015). Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *American Journal of Translational Research*, 7(12), 2527–2535.
- Yang, J.-A., Yeom, J., Hwang, B. W., Hoffman, A. S., & Hahn, S. K. (2014). In situ-forming injectable hydrogels for regenerative medicine. *Progress in Polymer Science*, 39(12), 1973–1986. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.07.006>
- Yap, L.-S., & Yang, M.-C. (2016). Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.094>
- Zhang, Z., Wang, J.-A., Xu, Y., Jiang, Z., Wu, R., Wang, L., ... Yu, H. (2013). Menstrual blood derived mesenchymal cells ameliorate cardiac fibrosis via inhibition of endothelial to mesenchymal transition in myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 168(2), 1711–1714. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.03.126>