

Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

**Estudio de un constructo 3D de PLA en
Ingeniería de Tejidos.**

Tesis.

Para obtener el título de:

Cirujano Dentista

Presenta:

Erika Resendiz Rueda

Director de Tesis:

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Sinodales:

Dr. Germán Isauro Garrido Fariña

Dr. Jose Francisco Gomez Clavel

Dr. Alejandro Garcia Muñoz

C.D. Esp. Rogelio Reyes Sanchez

Dra. Gemma Pascual Gonzalez

Cd. Mx. 2024



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.

Lo extraño es que aún hay mucho por caminar

Y la esperanza ya no está

Hace tiempo la fui a sepultar.

Enjambre. Y la esperanza.

Índice.

Agradecimientos.	5
Agradecimientos académicos.	7
Abreviaturas.	8
Figuras.	10
Tablas.	13
Gráficas.	13
Introducción.	14
Ingeniería de Tejidos Óseos (ITO).	14
Biomateriales, andamios en la ITO.	15
PLA en la ITO.	17
Células troncales mesenquimales.	18
MSCat en la ITO.	21
Señales.	21
Antecedentes.	24
Justificación.	25
Hipótesis.	26
Pregunta de investigación.	26
Objetivo General.	27
Objetivos Específicos.	27
Metodología.	28
Diseño del Estudio.	28
Obtención de las MSCat.	28
Diferenciación celular al Linaje osteogénico.	29
Preparación de los constructos para su implantación.	29
Implante de los constructos.	30
Seguimiento clínico de la inflamación.	31
Obtención de las muestras para su estudio histológico.	32
Descripción Histológica de piel de Rata.	32
Análisis y toma de fotografías y microfotografías de las muestras histológicas.	33
Resultados.	34
Muestras H-E.	34
Control de Inflamación.	42
Tricrómico de Masson TM.	49
Von Kossa.	57
Inmunohistoquímica.	60
Osteocalcina.	60
Microscopía electrónica de Barrido MEB.	70
Discusión	75

Conclusiones.	77
Anexo Metodología	78
Anexo 1. Manejo de los especímenes.	78
Anexo 2. Obtención de las MSCat.	78
Anexo 3. Obtención de las MSCost.	81
Anexo 4. Andamio de PLA.	81
Anexo 5. Implante de los constructos.	81
Anexo 6. Seguimiento clínico de la inflamación.	82
Anexo 7. Obtención y procesamiento de las muestras para su estudio histológico.	82
Anexos	93
BIBLIOGRAFÍA	94

Agradecimientos.

" Quiero estudiar en la UNAM " fue el pensamiento que tuve a mis 6 años de edad y el cual siguió presente hasta el día de hoy.

Agradezco al universo por ponerme en este camino y por todos los obstáculos y logros a lo largo de él, ya que sin ellos la vida no tendría mucho sentido.

Esta tesis y todos mis logros se los dedico a mis padres y hermano que han estado conmigo en todo momento y me han apoyado en todas mis decisiones, aunque a veces no muy convencidos, pero nunca me abandonaron en mis proyectos.

Gracias a ellos soy la mujer que soy ahora. Gracias por sus palabras y acciones que siempre me demostraron el gran amor que me tienen. Los amo nunca lo olviden.

A mi padre Alfonso Resendiz. Un hombre que ha sido muy trabajador desde pequeño, el cual nunca se rindió para lograr sus sueños y el de sus hijos, gracias a él aprendí a nunca darme por vencida y luchar por lo que más amo, él me dio las herramientas para seguir adelante y soñar en grande. Gracias papá te amo.

A mi madre Maricela Rueda. Una mujer decidida y directa, la cual me enseñó a no llorar cuando me caigo, si no a levantarme y no darme por vencida y que a veces es necesario verle el lado realista a la vida, seguir aunque duela porque así es la vida. Gracias mamá por tus sabios consejos y por estar ahí siempre. Te amo mamá, Gracias.

A mi hermano. Un hombre terco, que nunca duda en expresar lo que siente o lo que piensa. Gracias por ser mi compañero de juegos y risas de toda la vida, gracias por las peleas y discusiones que sin ellas la vida no tendría ese pequeño sazón de interés, el cual más adelante es grato recordar con risas , gracias por escucharme y estar ahí. Gracias hermano te amo.

También dedico esta tesis a mis abuelitos, que aunque ya no están conmigo, yo siempre los tuve presentes, en mis exámenes y proyectos, ellos en vida nunca se rindieron y yo tampoco lo haré. Los amo mucho donde quiera que estén.

A mis gordos (Pacho, Nala, Margaro, Eli, Huitlacochoa, Pitipu, Ramon, Chui, Rorro, Julio, Rita, Petunia, Principe pio, Rosendito, Azul y Rambo) mis cotorritos preciosos que llegaron a iluminar mi vida, que con su canto y travesuras hicieron que mi vida se vea llena de colores y ternura. Aunque Rorro, Rita, Julio y Rambo ya no están conmigo, siempre los llevaré en el corazón.

A mis amigos Jesús, Fanny, Fercha, Ale y Wences, personas tan maravillosas que me han brindado su amistad estos largos años, que siempre tiene cosas locas y divertidas que contarme. Nos hemos visto crecer profesionalmente y sinceramente estoy muy orgullosa de todos nosotros, espero siempre verlos triunfar y lograr sus sueños. Hoy este cachito de logro se los comparto. Gracias amigos.

A mis amigas y amigos de la carrera y clínica Marisol, Miri, Jhann y Javier. Gracias por todas las aventuras y experiencias juntos en la carrera, por las risas, patoaventuras y apoyo que me brindaron toda la carrera, sin ustedes hubiera sido un tormento la carrera. Los quiero mucho.

A mi amiga de primer año de carrera Dalia. Gracias por estar conmigo en el año más difícil para mí de la carrera, siempre estuviste conmigo en todo momento, siempre me diste ánimos para no darme de baja, siempre cantando canciones y contándonos cosas sin sentido, gracias por acompañarme a comer a cada puesto de la FES. Gracias amiga.

A mi roomie Joselin la cual estuvo conmigo esas madrugadas de estudio y me brindó sus carcajadas cuando más lo necesitaba. Gracias.

A mis amigos de servicio social, Liz, Luis y Areli, los cuales me apoyaron en toda esta tesis, vieron mis frustraciones y llantos cuando me tenía que quedar en el laboratorio. Gracias por acompañarme y jugar uno conmigo.

A mi amiga Mariana Mondragón, tu te mereces una dedicatoria especial porque me has aguantado en todo momento, en mis malos ratos, en mis berrinches, en mis alegrías, en fin en todo, gracias por apoyarme y ayudarme en donde me atoraba, siempre fuiste la mano que me ayudó a salir de lo más hondo, gracias te quiero mucho.

Pero sobre todo me dedico esta tesis, sonara un poco egoísta pero creo que me la merezco. Gracias Erika por no rendirte, por no dejar que las palabras te derrumben, por siempre tener por encima de ti, tus principios y valores, por siempre dar lo mejor de ti y nunca nunca rendirte. A veces te decían que NO podrías en tu cara pero te agradezco porque eres perseverante y lo lograste. Gracias por tener una gran imaginación y curiosidad sobre las cosas, por no abandonar esas cualidades, que algunas personas las vieron como un defecto pero tu las convertiste en algo preciado, por vencer tus temores y viajar al otro lado del océano para cumplir un pequeño sueño. Te amo nunca lo olvides.

Agradecimientos académicos.

Agradezco infinitamente a mis profesores de la facultad por realizarme como profesionista y compartir su conocimiento.

A la Esp. Aida Hernández Castañeda, la cual me animó a no darme de baja en la carrera y que me animó para ser una gran profesionista.

Al Esp. Rogelio Reyes Sanchezñ el cual me apoyo en mi primer año de la carrera y vio potencial en mí, sus palabras de verdad me ayudaron para seguir adelante.

Al Dr. Germán Isauro Garrido Fariña, gracias doctor por tenerme infinita paciencia en el laboratorio y lograr que obtuviera una gran curiosidad por la histología y en parte algo de veterinaria. Muchísimas gracias doctor.

A las doctoras Gemma, Selma, Barbara y Martha las cuales me impulsaron en mi gran decisión de querer dedicarme a la investigación. Gracias por las tardes de café y que mostrarme lo bonito de Madrid. Las quiero y las extraño.

Y por último pero la más importante en esta tesis, sin ella esto no sería en parte posible. La Dra. Cynthia Trejo, la cual me ayudó infinitamente en esta tesis, en conseguir mi beca para conocer España y que siempre tenía un problema ella estuvo para escucharme. Muchísimas gracias doctora.

Abreviaturas.

ITO: Ingeniería de Tejidos Óseos.

IT: Ingeniería de tejidos.

TC: Terapia Celular.

MO: Médula Ósea.

MO: Médula Ósea.

BMPS: Proteína Morfogénicas Óseas.

TGF-B: Factor de crecimiento transformante Beta.

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina.

FGF: Factor de crecimiento de Fibroblastos.

OC: Osteocalcina.

MEC: Matriz extracelular.

PLA: Poliacido láctico.

PCL: Policaprolactona.

PGA: Ácido poliglicólico.

PBH: Polihidroxibutirato.

MSC: Células troncales mesenquimales.

FDA: Administración de alimentos y medicamentos.

CMM: Células madres mesenquimales.

MSCat: Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

MSCost: Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo, diferenciadas a tejido osteogénico.

GICTIT: Grupo de Investigaciones en células troncales e ingeniería de tejidos.

LIOA: Laboratorio de investigación odontológica de CUSI Almaraz.

PSN: Penicilina estreptomycin Neomicina.

FBS: Suero Fetal Bovino.

H-E: Hematoxilina y Eosina.

TM: Tricrómica de Masson.

VK: Von kossa.

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido.

Figuras.

Figura 1 Representación de la triada de la ITO.

Figura 2 Representación de las propiedades ideales de un andamio en la ITO.

Figura 3 Fotografía del PLA al 10%.

Figura 4 Representación de la plasticidad de las MSC. Se describe la capacidad de las células para dar lugar a diferentes tejidos a través de la diferenciación.

Figura 5 Representación de las diferentes aplicaciones de las MSC en la terapia celular.

Figura 6 Representación de la obtención de las MSCat para su aplicación en la ITO.

Figura 7 Esquema de cómo las vías de señalización molecular y los factores de crecimiento estimulan la osteogénesis activando genes clave y factores de transcripción.

Figura 8 Representación del desarrollo de un constructo de 3D para la ITO.

Figura 9 Diseño experimental.

Figura 10 Fotografía del PLA.

Figura 11 Representación del andamio de PLA+ MSCost donde se dispuso de manera tridimensional.

Figura 12 Diseño experimental. Implantación subdérmica.

Figura 13 Piel de rata.

Figura 14 GELFOAM implantado en piel de rata a 21 días, teñida con H-E.

Figura 15 GELFOAM implantado en piel de rata a 60 días, teñida con H-E.

Figura 16 PLA implantado en piel de rata a 21 días, teñida con H-E.

Figura 17 PLA implantado en piel de rata a 60 días, teñida con H-E.

Figura 18 PLA+MSCat implantado en piel de rata a 21 días , teñida con H-E.

Figura 19 PLA+MSCat implantado en piel de rata a 60 días, teñida con H-E.

Figura 20 PLA+MSCost implantado en piel de rata a 21 días, teñida con H-E.

Figura 21 PLA+MSCost implantado en piel de rata a 60 días , teñida con H-E.

Figura 22 GELFOAM implantado en piel de rata a 21 días , teñida con TM.

Figura 23 GELFOAM implantado en piel de rata a 60 días , teñida con TM.

Figura 24 PLA implantado en piel de rata a 21 días , teñida con TM.

Figura 25 PLA implantado en piel de rata a 60 días , teñida con TM.

Figura 26 PLA+ MSCat implantado en piel de rata a 21 días, teñida con TM.

Figura 27 PLA+ MSCat implantado en piel de rata a 60 días, teñida con TM.

Figura 28 PLA+ MSCost implantado en piel de rata a 21 días, teñida con TM.

Figura 29 PLA+ MSCost implantado en piel de rata a 60 días, teñida con TM.

Figura 30 Fotomicrografías de los grupos del tiempo de estudio de 21 días (GELFOAM, PLA, PLA+MSCat y PLA+MSCost) teñidas con VK.

Figura 31 Fotomicrografías de los grupos del tiempo de estudio de 60 días (GELFOAM, PLA, PLA+MSCat y PLA+MSCost) teñidas con VK.

Figura 32 Control Positivo de VK (Mandíbula de Rata).

Figura 33 GELFOAM implantado en piel de rata a 21 días, a 10x, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 34 GELFOAM implantado en piel de rata a 60 días, a 10x, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 35 PLA implantado en piel de rata a 21 días, a 10x técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 36 PLA implantado en piel de rata a 60 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 37 PLA+MSCat implantado en piel de rata a 21 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 38 PLA+MSCat implantado en piel de rata a 60 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 39 PLA+MSCost implantado en piel de rata a 21 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 40 PLA+MSCost implantado en piel de rata a 60 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 41 Mandíbula de rata, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura 42 Fotomicrografía longitudinal del GELFOAM implantado en piel de rata *in vivo*, fotomicrografía tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 50x, 100x y 200x).

Figura 43 Fotomicrografía longitudinal del PLA implantado en piel de rata *in vivo*, fotomicrografía tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 50x, 100x y 200x).

Figura 44 Fotomicrografía longitudinal del PLA+MSCat implantado en piel de rata *in vivo*, fotomicrografía tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 50x, 100x y 200x).

Figura 45 Fotomicrografía longitudinal del PLA+MSCost implantado en piel de rata *in vivo*, fotomicrografía tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 50x, 100x y 200x).

Figura 46 Fotomicrografía PLA, tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 100x, 200x, 500x y 1000x).

Figura 47 Fotografías del proceso de inclusión en parafina.

Figura 48 Preparación de muestra para microscopía electrónica de barrido.

Tablas.

Tabla 1 Proceso del sembrado celular de los constructos y ambientación del andamio.

Tabla 2 Proceso de deshidratación de muestras para su inclusión.

Tabla 3 Proceso de la técnica de H-E.

Tabla 4 Proceso de la técnica de TM.

Tabla 5 Proceso de la técnica de VK.

Tabla 6 Especificaciones del anticuerpo (OC) ocupado en la inmunohistoquímica.

Tabla 7 Proceso de la técnica de inmunohistoquímica para OC.

Tabla 8 Proceso de muestras para microscopía electrónica de Barrido.

Gráficas.

Gráfica 1 Niveles de Inflamación 1° día.

Gráfica 2 Niveles de Inflamación 3° día.

Gráfica 3 Niveles de Inflamación 5° día.

Gráfica 4 Niveles de Inflamación 7° día.

Gráfica 5 Niveles de Inflamación 10° día.

Gráfica 6 Niveles de Inflamación 15° día.

Gráfica 7 Niveles de Inflamación 20° día.

Introducción.

Ingeniería de Tejidos Óseos (ITO).

Los huesos son susceptibles a daños significativos causados por fracturas, tumores, enfermedades sistémicas, envejecimiento, etc; y aunque el hueso tiene una gran capacidad de autorreparación o auto-regeneración, cuando el daño es demasiado grande tiene sus limitaciones, para ello, se ha creado la Ingeniería de tejidos óseos (ITO). (Barreto & F, 2009)

La ingeniería de tejido óseo (ITO) es una ciencia que tiene como objetivo regenerar el hueso perdido o dañado (Petre & Leeuwenburgh, 2022) a partir de los 3 componentes de la Ingeniería de Tejidos (IT): andamio (biomateriales), células y moléculas de señalización, que incluye el uso de células expandidas *in vitro* para ser sembradas en una matriz tridimensional, llamada andamio (que es el biomaterial bioactivo) y vías de señalización molecular intracelular y extracelular que provocan respuestas celulares específicas, con la finalidad de acelerar la producción eficiente de un hueso nuevo; para ello es necesario conocer algunos conceptos básicos de la ITO (Barreto & F, 2009, Majidinia et al., 2018, Martin-Piedra & Martin-Piedra, 2019 y Rather et al., 2019) **Figura 1.**

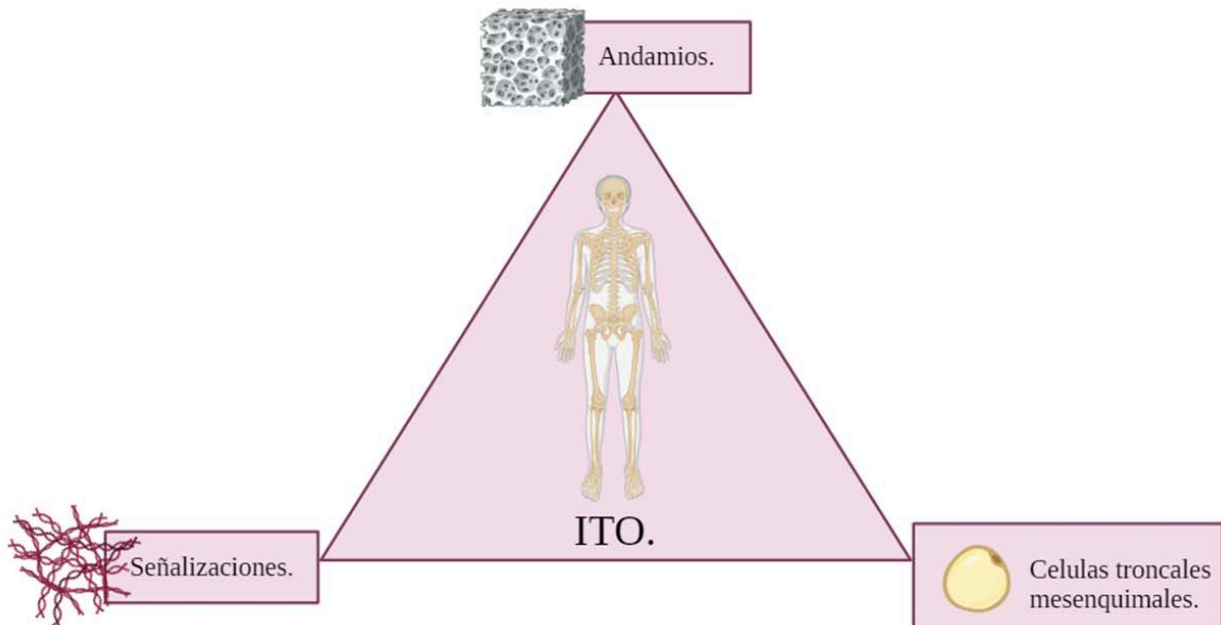


Figura 1 Representación de la triada de la ITO.

Las características esenciales que debe de haber para la regeneración ósea son:

Osteogénesis es la síntesis de hueso nuevo, a partir de las mismas células del huésped. Se inicia por inflamación, provocando la liberación de diversas citocinas y factores de crecimiento, lo que conduce al reclutamiento de células MSC y a la formación de vasculatura nueva, que da como resultado la formación de hueso nuevo funcional.

Osteoinducción: Es el proceso activo en el que el implante o biomaterial libera moléculas osteoinductoras (factores de crecimiento exógenos o citoquinas) que reclutan MSC inducen su diferenciación a células osteogénicas que formarán tejido óseo nuevo. El daño tisular estimula la reparación en los tejidos por parte de las células supervivientes y simultáneamente libera mensajeros o señales locales que guían la regeneración.

Osteoconducción: Es una propiedad de la matriz que proporciona una estructura física ideal (andamio) para el crecimiento óseo, e implica que las células formadoras de hueso se unan, crezcan y migren a través de un andamio que permite pasivamente el crecimiento interno de células, tejidos y la vascularización en la zona implantada. En la ITO la osteoconducción depende de los biomateriales utilizados para fabricar los andamios y de su interacción con el tejido huésped.

Osteointegración: Es el proceso biológico en el que el biomaterial o andamio se une e integra al tejido óseo; ciertos materiales como el acero inoxidable que no son biocompatibles ni biodegradables, pero también pueden inducir la osteogénesis mediante su interacción con tejido óseo donde son implantados.

Biomateriales, andamios en la ITO.

Los biomateriales son materiales empleados como dispositivos médicos y son denominados biocompatibles, porque no desencadenan respuestas inflamatorias, son bien tolerados por los tejidos vivos, pueden degradarse adecuadamente y tienen propiedades biomecánicas y estructurales adecuadas a los tejidos que sustituirán. Los biomateriales son empleados en forma de andamios con propiedades específicas para mejorar su éxito a largo plazo (Batista Cruzado, 2015); para crear una estructura sintética capaz de reemplazar e imitar a la MEC, acomodar y disponer las células para soportar la formación de tejido de forma tridimensional (Melek, 2015 y Roldán Vasco et al., 2016).

Según Su y Wubneh (Su et al., 2021 y Wubneh et al., 2018) las propiedades ideales de un andamio para su uso en la ITO son :

1.- **Permeabilidad con adecuada porosidad** de la superficie para permitir la transferencia de fluidos biológicos.

2.- **Rugosidad adecuada** de la superficie para promover la supervivencia, proliferación y diferenciación celular para la osteoconductividad.

3.- **Biocompatibilidad** es la tolerancia de los tejidos al biomaterial con la finalidad de minimizar los riesgos de toxicidad local y reacciones inmunitarias/inflamatorias no deseadas.

4.- **Biodegradabilidad** y eliminación de productos de degradación por los procesos metabólicos fisiológicos. La tasa de degradación del andamio debe ser lo más cercana posible a la tasa de crecimiento del tejido óseo nuevo para que se produzca una regeneración real.

5.- **Arquitectura interna** con un diseño y distribución de la porosidad para facilitar la supervivencia y proliferación de la estructura con células para la inducción/formación de tejido nuevo.

6.- **El tamaño del poro** es una característica en el diseño de los andamios que permite un adecuado desempeño del proceso de regeneración tisular y de neovascularización. En general, en el tejido óseo, los tamaños de poro más pequeños (<75 μm) resultan adecuados para la formación de tejidos fibrosos, mientras que los tamaños de poro intermedios (75–100 μm) son más adecuados para la formación de tejido óseo no mineralizado, y los poros más grandes (>200 μm) son adecuados en la formación de tejido óseo completamente mineralizado. La formación ósea, requiere un mínimo de tamaño de poro de 100 a 150 μm , mientras que para la vascularización debe ser >300 μm . En general, se recomienda un rango de tamaños de poro de 50 a 1000 μm para el crecimiento celular y la recuperación completa, así como el crecimiento y conexión de vasos sanguíneos y nervios. (Karageorgiou & Kaplan, 2005 y Roldán Vasco et al., 2016)

6.- **Propiedades biomecánicas** que coincidan con su aplicación clínica. **Figura 2.**

Actualmente, la ITO está empleando polímeros sintéticos como biomateriales para diseñar y fabricar andamios, que tienen como ventajas que son reabsorbibles y su degradación puede ser controlada, además de ser accesibles y poco costosos, algunos de los polímeros más empleados son: el ácido poli-láctico (PLA), policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA) y polihidroxibuterato (PHB) (Perán et al., 2013 y Tajbakhsh & Hajiali, 2017)

- Permeabilidad.
- Rugosidad adecuada.
- Biocompatibilidad
- Biodegradabilidad.
- Arquitectura interna.
- Coincidencia.

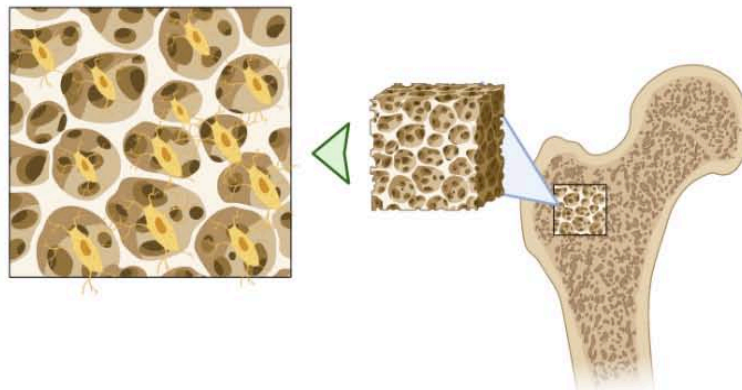


Figura 2 Representación de las propiedades ideales de un andamio en la ITO.

PLA en la ITO.

El PLA (ácido poliláctico) es un poliéster alifático hidrofóbico lineal termoplástico que fue descubierto en 1932 por Wallace Carothers. En general, el PLA está clasificado como un material seguro para ser usado en la fabricación de dispositivos médicos, por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (**FDA**) desde el año de 1970. (Segura González, 2016 y Singhvi et al., 2019)

El PLA químicamente es un material inerte que se obtiene a partir de fibras naturales como el maíz, trigo y arroz, por lo que es amigable con el medio ambiente, biodegradable, reciclable y compostable. (Chen et al., 2021). El PLA se biodegrada por hidrólisis y actividad enzimática. Tiene una baja tasa de degradación de entre 10 meses y 4 años. (Tajbakhsh & Hajiali, 2017) Su semi-permeabilidad al agua y al oxígeno lo hacen más susceptible a la degradación. La difusión de agua en la estructura interpolimérica del PLA, degrada su microestructura interna, debido a la formación de cavidades, por lo que su degradación también depende del pH y la temperatura tisular, así como de procesos enzimáticos asociados, como lo puede ser una infección o procesos inflamatorios. Tiene una amplia gama de propiedades mecánicas y físicas que permiten que pueda diseñarse para adaptarse a múltiples aplicaciones y tiene baja inmunogenicidad. (Tyler et al., 2016)

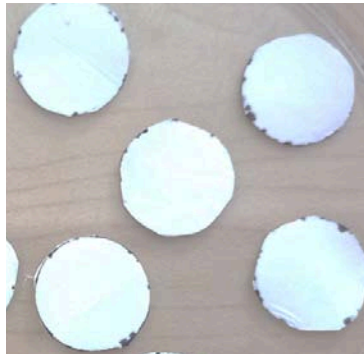


Figura 3 Fotografía del PLA al 10% electrohilado.

Células troncales mesenquimales.

Las células troncales mesenquimales (MSC) se han definido como: células multipotentes indiferenciadas, con una alta capacidad de autorrenovación y alta tasa de proliferación (Dominici et al., 2006). Los *criterios mínimos* para definir a las MSC son: adherencia al plástico, expresión positiva para los marcadores CD73, CD90 y CD105, carecer de expresión de los marcadores hematopoyéticos y endoteliales CD11b, CD14, CD19; CD34, CD45, CD79a y HLA-DR y capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Las MSC para ser utilizadas en la IT deben cumplir con los siguientes criterios (Gimble et al. 2007):

1. Presencia en cantidades muy abundantes en el tejido donante (millones a billones de células).
2. Fácilmente aislables y a través de procedimientos mínimamente invasivos.
3. Ser diferenciables hacia múltiples linajes celulares de manera regulable y reproducible.
4. Transplantables en forma autóloga o alogénica.
5. Manipulables de acuerdo a las actuales Guías de Buenas Prácticas. (Meruane & Rojas, 2010 y Gimble et al., 2007).

Sus características son:

- 1. Indiferenciadas:** Son células que carecen de marcadores de diferenciación específicos.
- 2. Quiescencia y Autorrenovación:** Tienen la potencialidad de proliferación por tiempos prolongados.
- 3. Alta tasa de supervivencia y proliferación:** Capacidad de automantener la población en número relativamente estable, a través del mecanismo de división asimétrica, por la que cada

célula troncal produce al dividirse dos células hijas: una de ellas conserva las características de célula troncal, y la otra célula adquirirá la determinación hacia un linaje.

4. Pluripotencialidad y capacidad de diferenciación: Producen células transitorias, comprometidas a determinados linajes celulares que, a su vez, son las que darán origen a las células diferenciadas y funcionales de los distintos órganos.

5. Plasticidad: Es el potencial de ser inducidas a distintos tipos de linajes. (Pérez Millán & Lorenti, 2006, Viswanathan et al., 2019 y Chimal et al., 2013). **Figura 4.**

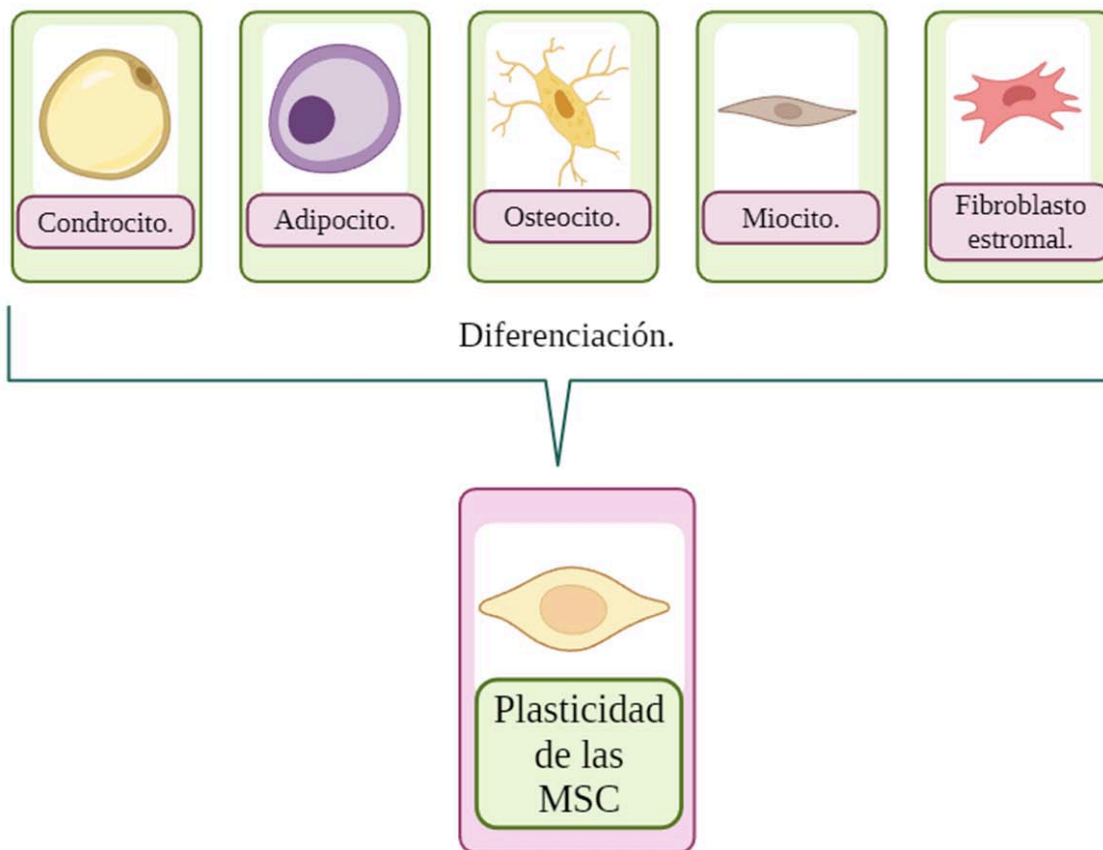


Figura 4 Representación de la plasticidad de las MSC. Se describe la capacidad de las células para dar lugar a diferentes tejidos a través de la diferenciación. Imagen modificada de (Chimal et al., 2013)

El empleo de MSC en la IT:

- 1.- Terapia celular (TC), que es la Implantación directa de MSC para la construcción de nuevas estructuras tisulares.
- 2.- Implantación de MSC pre-tratadas para inducir las a que realicen una diferenciación concreta. La fue empleada en esta tesis. **Figura 5.**
- 3.- Estimulación de células MSC endógenas para que puedan sustituir los tejidos dañados. (Moreno, 2008)

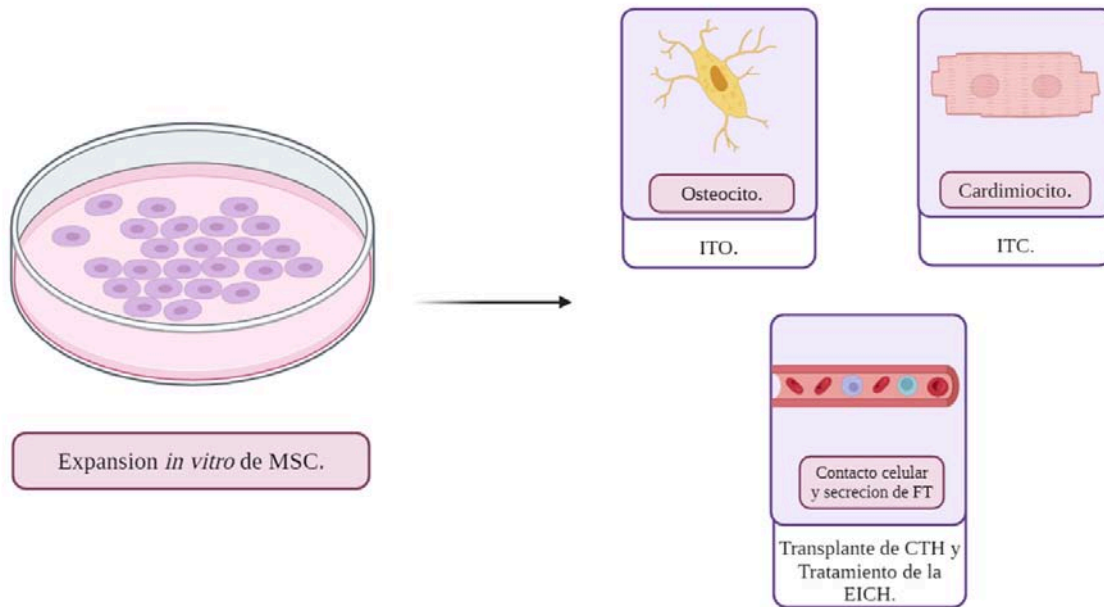


Figura 5 Representación de las diferentes aplicaciones de las MSC en la terapia celular. Imagen modificada de (Chimal et al., 2013)

Las MSC tienen una amplia variedad ya que existen en casi todos los tejidos posnatales, desde la médula ósea (MO) (Kemp et al., 2005), piel (Salerno et al., 2017), músculo (De Bari et al., 2003), tejido adiposo (Zuk et al., 2002) o sangre periférica (He et al., 2007), etc. y presentan diferentes capacidades de proliferación, diferenciación y distinto grado de dificultad en su aislamiento y obtención.

MSCat en la ITO.

Las MSC se han extraído de diferentes fuentes tisulares, en particular las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo (MSCat) tienen la ventaja de provenir de una fuente abundante, son fáciles de extraer mediante un procedimiento altamente reproducible, además, son altamente proliferativas, presentan baja inmunogenicidad y su capacidad para autorrenovarse, diferenciarse en diferentes progenitores específicos de tejido, migrar a sitios dañados y actuar a través de vías autocrinas y paracrinas. (Zuk et al., 2002, Bourin et al., 2013, Bunnell, 2021 y Mazini et al., 2021). **Figura 6.**

Diversos estudios (Fang et al., 2014) han demostrado que las MSCat tienen una capacidad de osteodiferenciación óptima, por lo que son una opción prometedora para la regeneración ósea, esto, debido a su capacidad de diferenciación en osteoblastos y a los efectos paracrinos que facilitan la migración y diferenciación de las células. (Liao & Chen, 2014 y Martínez Blázquez, 2023).

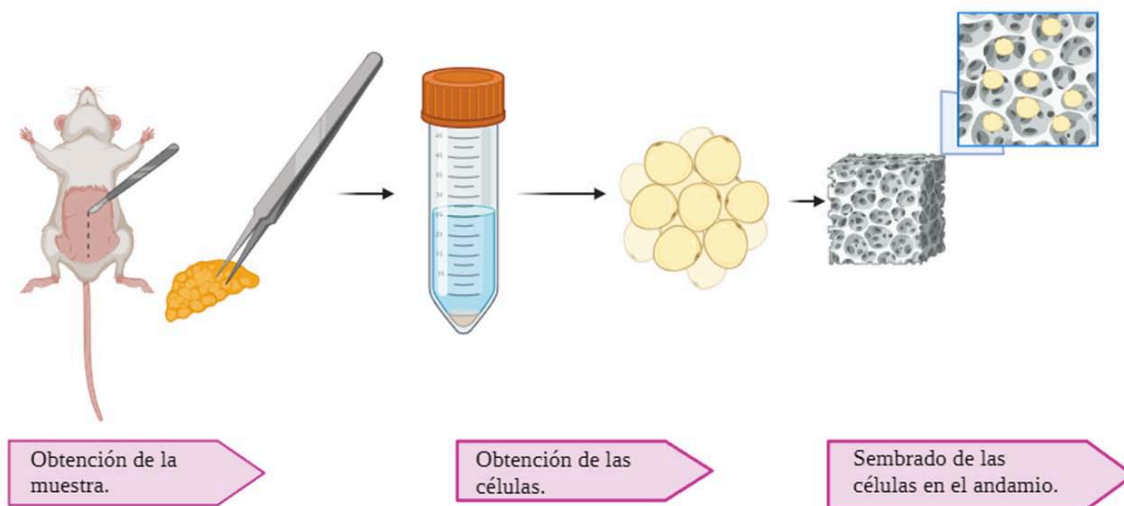


Figura 6 Representación de la obtención de las MSCat para su aplicación en la ITO.

Señales.

Las células se comunican entre sí mediante señales químicas, que son proteínas, moléculas o factores de crecimiento producidos, secretados y liberados en el espacio extracelular por una célula emisora; que se dirigen hacia células diana. La célula diana debe tener el receptor adecuado para esa señal y cuando la molécula señalizadora se une a su receptor, altera la forma o actividad del receptor, lo que desencadena un cambio dentro de la célula. (López & David, 2019) Estas señales facilitan el crecimiento tisular y su reparación/regeneración. (Aguilar et al., 2021). **Figura 7.**

Los factores de crecimiento son capaces de inducir, estimular y fomentar la proliferación celular cuando un daño ocurre y se debe reparar/regenerar un tejido específico. (López & David, 2019), algunas proteínas y nucleótidos son importantes para la proliferación y diferenciación de las células. Dichos elementos son secretados por la células de manera endógena, pero también pueden ser el resultado de señales paracrinas con células vecinas. En general, estas biomoléculas funcionan para potenciar la bioactividad de un biomaterial en diferentes aplicaciones de la IT. (Serrato Ochoa et al., 2015 y Roldán Vasco et al., 2016).

Un factor de crecimiento es un señalador biomolecular que se une a receptores específicos sobre la misma célula, que estimula a su vez la secreción de diversos factores en cascada, lo que inicia una serie de eventos como proliferación celular, diferenciación, maduración, producción de otros factores de crecimiento y matriz extracelular, que resulta en la producción/reparación/regeneración de tejidos específicos. (Aguilar et al., 2021)

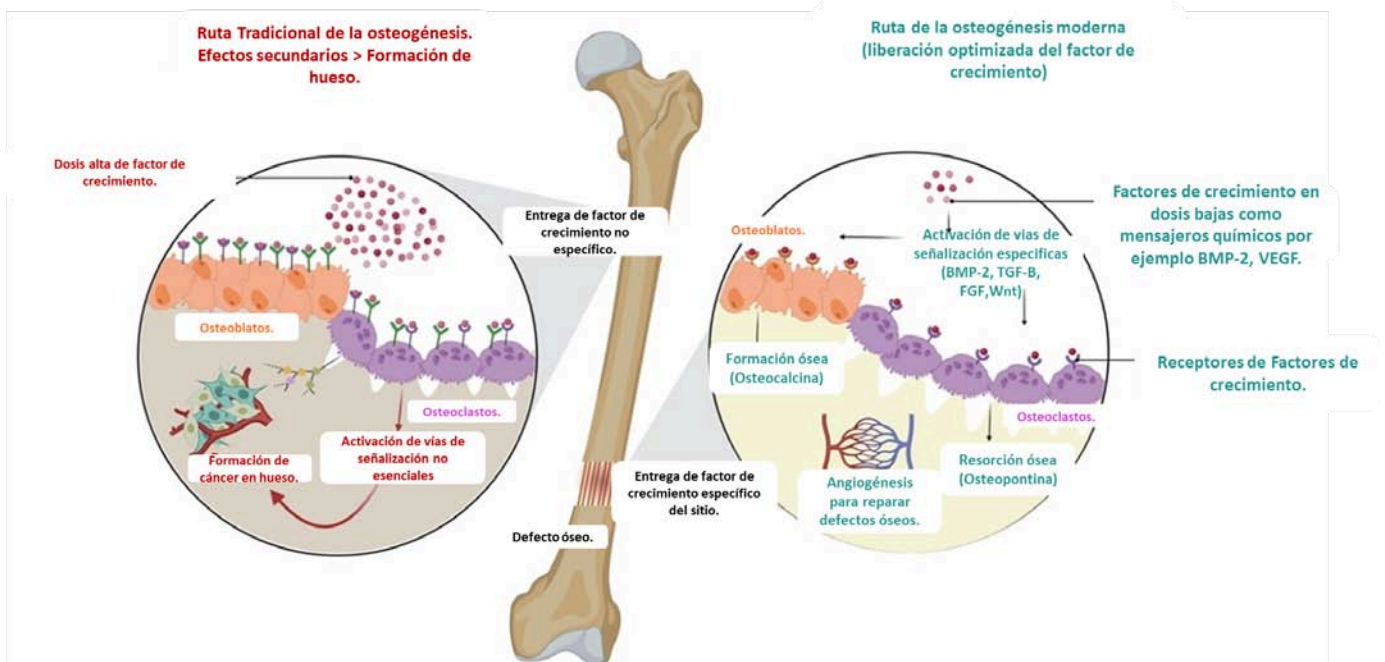


Figura 7 Esquema de cómo las vías de señalización molecular y los factores de crecimiento estimulan la osteogénesis activando genes clave y factores de transcripción. En dicho esquema se plantean 2 rutas. 1 Ruta de la osteogénesis moderna, en donde es liberado un factor de crecimiento específico en un defecto óseo. 2 Ruta tradicional de la osteogénesis, en donde es liberado un factor de crecimiento no específico. Imagen modificada de (Dhawan et al., 2022)

En el caso de las MSCat diferentes moléculas o factores de crecimiento inducen su diferenciación al linaje osteogénico *in vitro*. Desde 2001 fue reportado desde 2002 por Zuk y cols (Zuk et al., 2002), que para su inducción al linaje osteogénico las MSCat deben ser cultivadas de 2 a 4 semanas en medio de cultivo “osteogénico” que contenga (Wang et al., 2011), dexametasona que promueve la diferenciación celular hacia el linaje osteogénico; el β-glicerol-fosfato que brinda soporte en el camino de la diferenciación controlando la mineralización y la actividad osteoblástica; y ácido ascórbico que ayuda al incremento de la

fosfatasa alcalina y promueve la producción de osteocalcina(OC). (Morales Restrepo, 2011). **Figura 8.**

La diferenciación de las MSCat implica una regulación compleja a través de una interacción de estímulos extracelulares, que involucran factores de crecimiento osteogénicos extrínsecos y ligandos proteicos como por ejemplo: proteínas morfogénicas óseas (BMPs), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), etc.), además de la transmisión de fuerza biomecánica. (Rather et al., 2019). **Figura 11.**

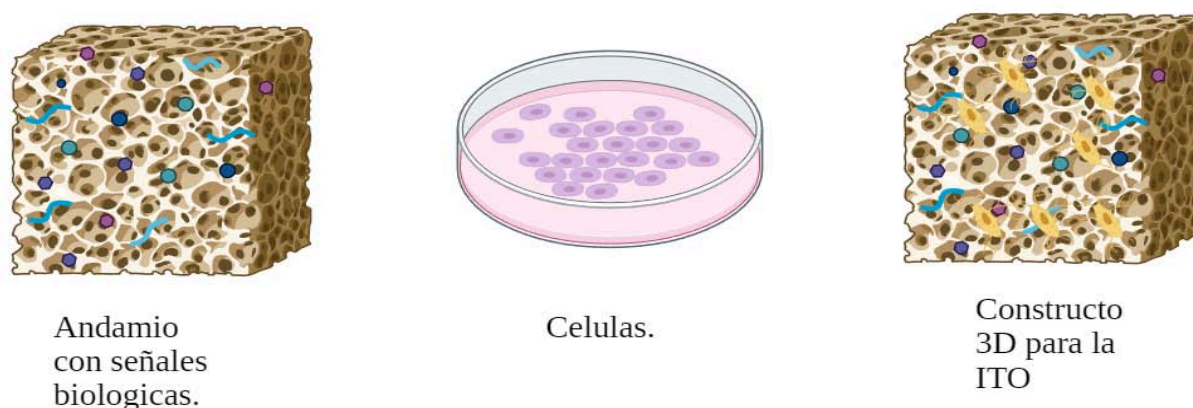


Figura 8 Representación del desarrollo de un constructo de 3D para la ITO. Donde en un andamio se le incorporan señalizaciones y se le incorporan MCS para crear una función específica.(Rather et al., 2019)

Por lo tanto en la ITO, un constructo equivalente tisular o tejido artificial que mimetice al tejido óseo debería de estar, en principio, compuesto por tres elementos fundamentales: el primero, una matriz o andamio que simula a la MEC; el segundo, una población celular que proporcione o facilite las propiedades ideales de osteoconducción y osteoinducción; y tercero, una señal o molécula para inducir la osteogénesis.

Antecedentes.

Previamente, se ha demostrado que el PLA es biocompatible y con una buena adhesión celular Ali y colaboradores (Valencia et al., 2017) lo demostraron en su trabajo en el que evaluaron la respuesta de adhesión, viabilidad celular y la interacción célula-material de diferentes andamios fabricados con de PLA y PLA+hidroxiapatita, utilizando células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea. Concluyeron que la técnica de electrohilado permite obtener membranas nanofibrilares PLA que podrían tener una aplicación directa en el campo de la ITO.

Sahar y colaboradores (Sahar et al., 2012) diferenciaron con éxito en células endoteliales (MSCat-Endo) y osteoblastos (MSCost), utilizando medios suplementados y plantearon que las células MSCat diferenciadas a células endoteliales mejoran la vascularización con una contribución mínima a la formación ósea cuando se colocan solas en una estructura de PLA. Luego, emplearon PLA como control, MSC indiferenciadas (MSC), MSC diferenciadas a medio osteogénico (MSCost) y MSC diferenciadas endoteliales (MSC-Endo) y los evaluaron en el defectos en calvaria de rata de Lewis (n=34) a 8 semanas. Después, se evaluó el volumen óseo y la población de microvasos mediante análisis de tomografía computarizada y tinción histológica. Con esto concluyeron que la revascularización del biomaterial PLA con células MSC-Endo no aumentará la formación de hueso por sí sola, pero puede utilizarse como una fuente de células para mejorar la vascularización y mejorar potencialmente la función de los osteoblastos existentes.

Wang y colaboradores (Wang et al., 2021) utilizaron MSCat que fueron diferenciadas al linaje osteogénico y se estudió su incorporación en estructuras de coral con la finalidad de crear hueso. Crearon complejos de láminas de coral (armazones de coral envueltos con células laminares MSCat, que implantaron en bolsas cutáneas en ratones desnudos, a 8 semanas. Los resultados fueron que se formó más tejido altamente denso en el grupo complejo que en el grupo control (p=0.0004), por tanto concluyeron que las MSCost podrían usarse para construir hueso diseñado y la incorporación de las MSCat a las estructuras de coral mejoran significativamente la formación de hueso.

Xiao Lu y colaboradores (Liu et al., 2023) evaluaron la biocompatibilidad y la eficacia de reparación ósea de andamios de PLA con hidroxiapatita. Realizaron pruebas mecánicas y experimentos *in vitro* e *in vivo* para analizar el impacto del diseño estructural y el microambiente en la osteogénesis. Sus resultados indicaron que el andamio de PLA conservó su macroestructura después de las modificaciones de la funcionalización, como la porosidad del 84.1% y poros con un tamaño de 350 μm . El andamio funcionalizado demostró hidrofiliidad y biocompatibilidad adecuada, además de promover la adhesión celular, la proliferación y la expresión de genes osteogénicos (ALP, OPN, COL-1, OCN y RUNX2). Concluyeron que el andamio logró reparar eficazmente defectos óseos de tamaño crítico en el radio de conejo, lo cual sugiere que el uso de andamios de PLA son una estrategia novedosa para el tratamiento de defectos óseos de tamaño crítico.

Justificación.

El hueso sano conserva una regeneración de manera natural, pero esta puede verse disminuida por factores como: el proceso de envejecimiento, procesos infecciosos o traumáticos; y cuando además, los pacientes tienen algún padecimiento sistémico la regeneración se ve limitada o anulada, es por ello que, la ITO estudia nuevas alternativas de tratamientos.

En la actualidad, en el área maxilofacial, el tratamiento para regenerar hueso considerado como el estándar de oro son los **autoinjertos**, ya que tienen como principal ventaja que no presentan rechazo inmunológico, sin embargo, sus desventajas son: que requieren de procedimientos invasivos, doble cirugía, comprometen otras zonas anatómicas, presentan alta posibilidad de comorbilidad y complicaciones quirúrgicas o post-quirúrgicas como infección, dolor, hemorragia, debilidad muscular y/o lesiones neurológicas. Otros factores que pueden influir en el fracaso de los autoinjertos son los hábitos del paciente, como fumar o su estado de salud sistémico.

Otra opción son los **aloinjertos**, que provienen de otro sujeto o donante de la misma especie, como: injertos de donantes cadáveres o de donantes vivos; aunque son difíciles de obtener ya que se requiere del consentimiento del donante o sus familiares, lo que representa un gran reto debido a la falta de donantes; además, como principal desventaja son costosos.

También se presentan como alternativa los **Xenoinjertos** que se caracterizan por ser heterólogos (animales o matrices óseas). Las ventajas que estos poseen es que son biocompatibles, poseen las características de osteoinducción y osteointegración. Sin embargo, sus limitaciones pueden ser: su resistencia mecánica baja, se debe colocar en ausencia de infección local y en lecho de hueso esponjoso bien vascularizado, además del rechazo inmunológico que pudieran generar.

Otro tipo de injerto, que será analizado en esta tesis son los **Aloplásticos**, que son materiales sintéticos que dependiendo su utilidad se definen sus propiedades físicas, cristalográficas y sus propiedades químicas, sus principales ventajas es que pueden ser altamente biocompatibles, con un diseño y estructura que les permitan tener la permeabilidad, porosidad y rugosidad adecuada para el sitio a regenerar, una de las posibles desventajas de estos puede ser su bajo índice de degradación.

Para determinar que un injerto aloplástico será útil en ITO, se debe de evaluar su biocompatibilidad, citocompatibilidad y la seguridad en su uso antes de pensar en su aplicabilidad en humanos, es por ello que se emplean modelos in vitro e in vivo, a fin de determinar que estas ventajas sean reales y que su uso sea seguro para los tejidos y para el individuo, es por ello que en esta tesis nos planteamos evaluar si un constructo hecho con un andamio de PLA sembrado con MSCost (MSCat diferenciadas al linaje osteogénico) posee las propiedades de osteoconducción y osteoinducción cuando es implantando de manera subcutánea en rata.

En la ITO, las **MSC** son ampliamente empleadas para la creación de constructos, que con el uso de membranas, en este caso de PLA, lograremos que asemejen al tejido, como “un tejido artificial” que sea eficaz y seguro para el paciente.

Hipótesis.

El constructo hecho de andamios de PLA sembrados con MSCat diferenciadas al linaje osteogénico cuando es implantado en el tejido subcutáneo en el dorso de rata sí formará tejido mineralizado.

Pregunta de investigación.

¿Si implantamos constructos de PLA sembrados con MSCat diferenciadas al linaje osteogénico en el dorso de rata, las MSCat serán capaces de formar tejido mineralizado?

Objetivo General.

- Evaluar la respuesta MSCat diferenciadas al linaje osteogénico en el constructo cuando son implantadas en el tejido subcutáneo del dorso de la rata.

Objetivos Específicos.

- Describir histológicamente como interaccionan los constructos de PLA con el tejido subcutáneo de rata.
- Determinar si hay mineralización en el tejido o en el constructo, después de su implante en el tejido subcutáneo del dorso de la rata.
- Determinar si hay presencia de marcaje positivo para OC en el tejido subcutáneo del dorso de la rata.

Metodología.

Los experimentos de la presente tesis fueron realizados en el Grupo de Investigación en Células Troncales e Ingeniería de Tejidos (GICTIT), del Laboratorio de Investigación Odontológica de la CUSI Almaraz (LIOA) que pertenece a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) y en la Unidad de aislamiento y Bioterio de la FES Cuautitlán Campo 4 (FESC-C4). Para ello, se contó con los avales de la FES-I, comisión de Bioseguridad folio: 147, y comisión de ética oficio: CE/FESI/112019/1333. Los especímenes fueron manejados bajo las normas oficiales mexicanas. **Ver Anexo 1.**

Diseño del Estudio.

Se emplearon 40 ratas de la cepa Wistar, de ambos sexos con un peso inicial de 200+/-50g. En todos los especímenes se les realizó el implante subdérmico del andamio, constructos y biomateriales y se separaron aleatoriamente en los siguientes grupos: GELFOAM, PLA, PLA+MSCat, PLA+MSCost. Los tiempos de estudio fueron: 21 y 60 días. **Figura 9.**

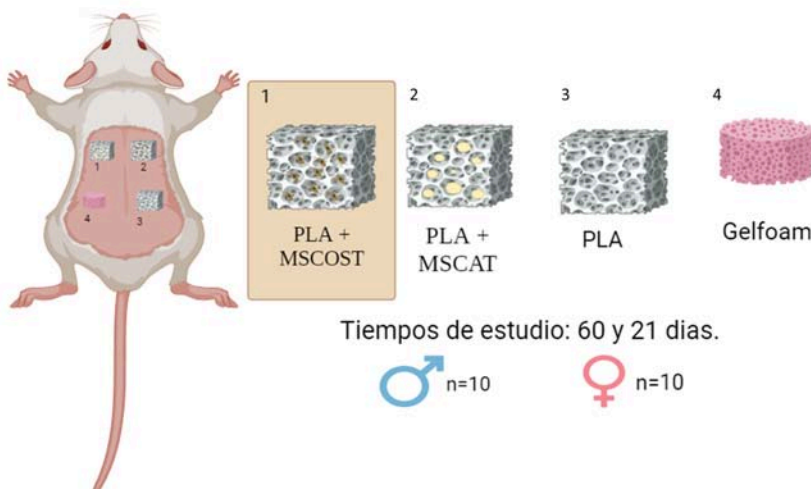


Figura 9 Diseño experimental. De cada tiempo de estudio (21 y 60 días) se utilizaron 10 ratas macho y 10 ratas hembra. **1 PLA+MSCost** (Implante del constructo subdérmico superior derecha) **2 PLA+MSCat** (Implante del constructo subdérmico superior izquierda) **3 PLA** (Implante subdérmico del andamio de PLA inferior derecha) **4 Gelfoam** (Implante subdérmico del biomaterial inferior izquierda).

Obtención de las MSCat.

A los especímenes se les extrajo el tejido adiposo subcutáneo de la zona inguinal, posteriormente, se procesaron los tejidos obtenidos para el aislamiento, obtención y cultivo de

las MSCat que se mantuvieron en condiciones estándares (37°C con 5% de CO² y humedad relativa). **Ver Anexo 2.**

Diferenciación celular al Linaje osteogénico.

Se realizó la inducción osteogénica en el tercer subcultivo. **Ver Anexo 3**

Preparación de los constructos para su implantación.

Los andamios de PLA al 10% (preparado con 10 gr de PLA, 75 ml de cloroformo y 25 ml de etanol) se realizaron mediante la técnica de electrohilado, de forma laminar con un grosor de 0.7 a 1 mm, fueron elaborados en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, UNAM, que está a cargo del Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez. **Figura 10.**



Figura 10 Fotografía del PLA al 10% (preparado con 10 gr de PLA, 75 ml de cloroformo y 25 ml de etanol) se realizaron mediante la técnica de electrohilado, de forma laminar con un grosor de 0.7 a 1 mm fueron elaborados en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, UNAM, que está a cargo del Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez.

Para realizar los constructos, el PLA fue cortado y esterilizado con UV durante 30 min e hidratado con medio de cultivo D/MEM suplementado y cultivados en condiciones estándares.

Nuestros **constructos** fueron de tres capas de PLA, cada una sembrada con las MSCat o MSCost. **Tabla 1.**

Andamio y constructos.	Medio de cultivo
PLA	D/MEM completo.
PLA+MSCat	D/MEM completo, se sembraron 1250 células por mm ² (MSCat) por constructo.
PLA+MScost	D/MEM completo adicionado con Dexametasona 0.1mM beta-glicerol-fosfato 10 mM y ascorbato 2 fosfato 10 mM se sembraron 1250 células por mm ² (MSCat) por constructo.

Tabla 1 Proceso del sembrado celular de los constructos y ambientación del andamio.

Para la elaboración del constructo, después de sembrar las células en los andamios, se colocó en disposición 3D como se muestra en la siguiente imagen: **Figura 11**.

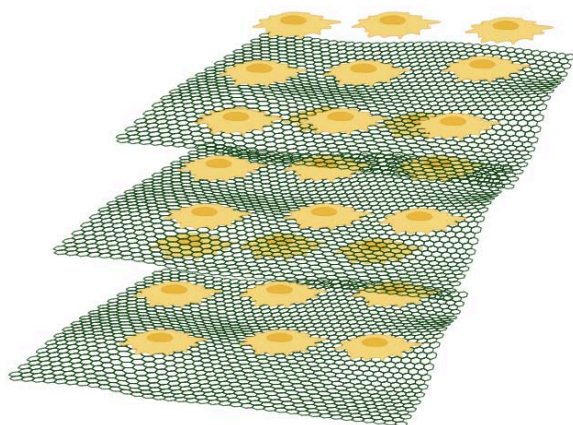


Figura 11 Representación del constructo PLA + MScost donde se dispuso de manera tridimensional:

1. Células
2. PLA
3. Células
4. PLA
5. Células
6. PLA

Antes de su implantación en los especímenes, se unieron las 3 capas con un punto simple de sutura seda 3/0, para después, identificar el constructo en el sitio de implantación.

Implante de los constructos.

Una vez elaborados los constructos se implantaron en el dorso del espécimen de la siguiente manera: **Figura 12. Ver Anexo 5.**

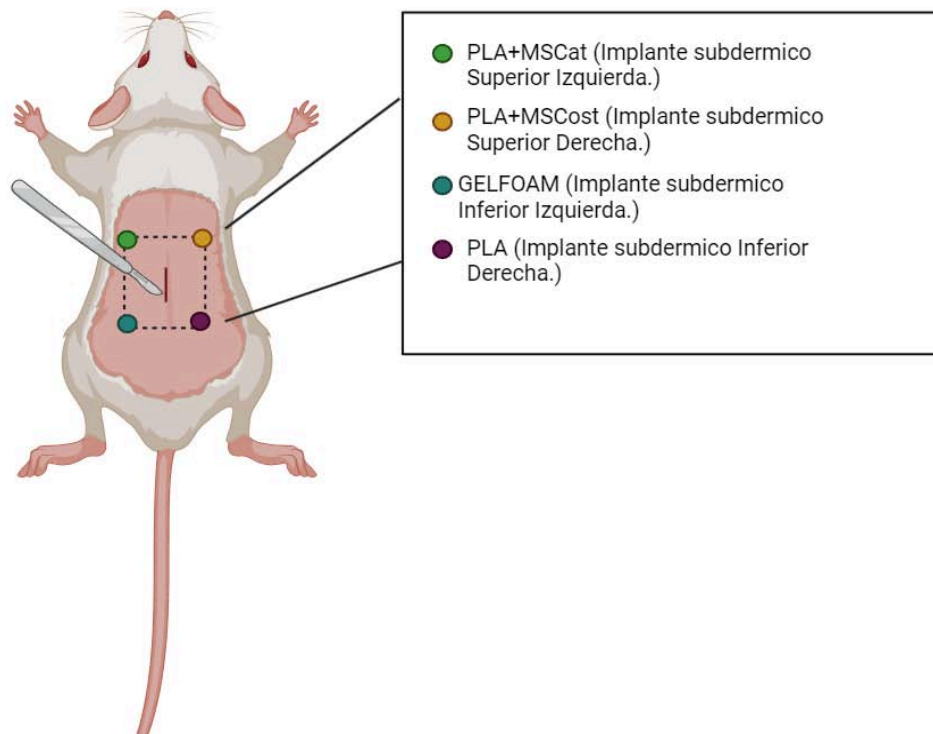


Figura 12 Diseño experimental. Implantación subdérmica.

Seguimiento clínico de la inflamación.

Durante el tiempo de estudio posquirúrgico, se observó diariamente a todos los especímenes y se realizaron registros fotográficos con ayuda de una cámara digital Huawei P30 lite con zoom al 4.0X sin filtro.

A cada espécimen se le tomaron 3 fotografías en cada momento, correspondientes a los siguientes periodos de tiempo:

Grupo de 21 días: 1,3,5 y 6 días

Grupo de 60 días: 7,10,15,20 días.

Se revisaron los signos cardinales de la inflamación (calor, edema, rubor, tumefacción y pérdida de la función) y se evaluó así el grado de inflamación, clasificándolo como severa, moderada, leve y nula. **Ver Anexo 6.**

Obtención de las muestras para su estudio histológico.

Las muestras se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 5 μm y se tiñeron con Hematoxilina & Eosina (**H-E**) y tinción Tricrómica de Masson (**TM**), se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para evidenciar Osteocalcina (Osteocalcina Rabbit Sc-30044, 1:100), también se realizó una técnica de Von Kossa para evidenciar apósitos de Calcio en nuestros constructos y se analizaron las muestras en un microscopio electrónico de barrido. **Ver Anexo 7.**

Descripción Histológica de piel de Rata.

Se hicieron tinciones de H-E y con el apoyo de la fotomicrografía se localizó y describió de manera clara las estructuras.

Para describir la piel de la rata es necesario mencionar que en los mamíferos existen 2 tipos de tegumentos, la piel gruesa y la piel fina. Las cuales se diferencian debido a su grosor determinado por su localización y función.

En este caso hablaremos de piel de la parte dorsal de la rata, la cual es una piel delgada y sus estructuras son: **Epidermis:** La cual es la capa más externa, es delgada y cuenta con crestas epidérmicas. **La dermis:** Se encuentra por debajo de la Epidermis, está conformada por tejido conectivo laxo, contiene muchas fibras de colágenas y reticulares, además de contar con muchos folículos pilosos. **Músculo estriado esquelético:** Está formado por células alargadas llamadas miocitos o fibras musculares.

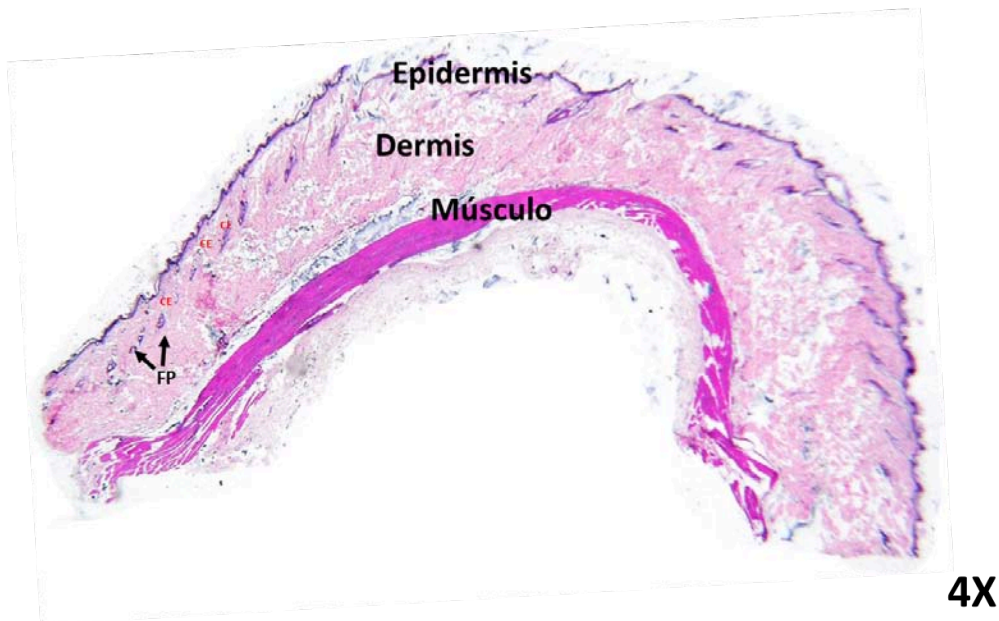


Figura 13 Piel de rata. En la siguiente fotomicrografía podemos describir las siguientes estructuras: **Epidermis:** La cual es delgada y sus Crestas Epidérmicas (**CE, marcadas con círculos rojos**) son poco pronunciadas. **Dermis:** Está formada por tejido conectivo laxo, es rica en fibras de colágeno y reticulares en ella se encuentran abundantes folículos pilosos. **Músculo subcutáneo:** Es un músculo estriado esquelético el cual está formado por células alargadas llamadas miocitos o fibras musculares.

Análisis y toma de fotografías y microfotografías de las muestras histológicas.

Para la toma de Fotografías y microfotografías de (H-E, TM,VON KOSSA, inmunohistoquímica OC), se utilizó un microscopio óptico **ZEISS axio lab a1**, una cámara fotográfica **Nikon coolpix** y un celular **Galaxy A32**.

Para las microfotografías de MEB, se realizaron en un microscopio electrónico de barrido **Jeol JSM-IT500 InToucheScope**.

Resultados.

Muestras H-E.

Para determinar nuestro segundo objetivo específico: “**Describir histológicamente como interaccionan los constructos realizados con el tejido subcutáneo de rata**”, realizamos el análisis Histológico de H-E, buscamos evidenciar en los grupos y tiempos de estudio la interacción que estos presentaron con los tejidos del espécimen.

De manera general observamos que en todos los grupos no existió rechazo, se apreció que en los constructos y el andamio, entre sus capas existían abundantes células, además de estar rodeados de tejido conjuntivo. En GELFOAM 21 días fue encapsulado en tejido fibroso y en el grupo de GELFOAM 60 días se absorbió completamente.

GELFOAM 21 días.

En este grupo se observó el biomaterial encapsulado en tejido fibroso, probablemente tejido conectivo, y sin alteraciones en el tejido, aún se observa la estructura del biomaterial.

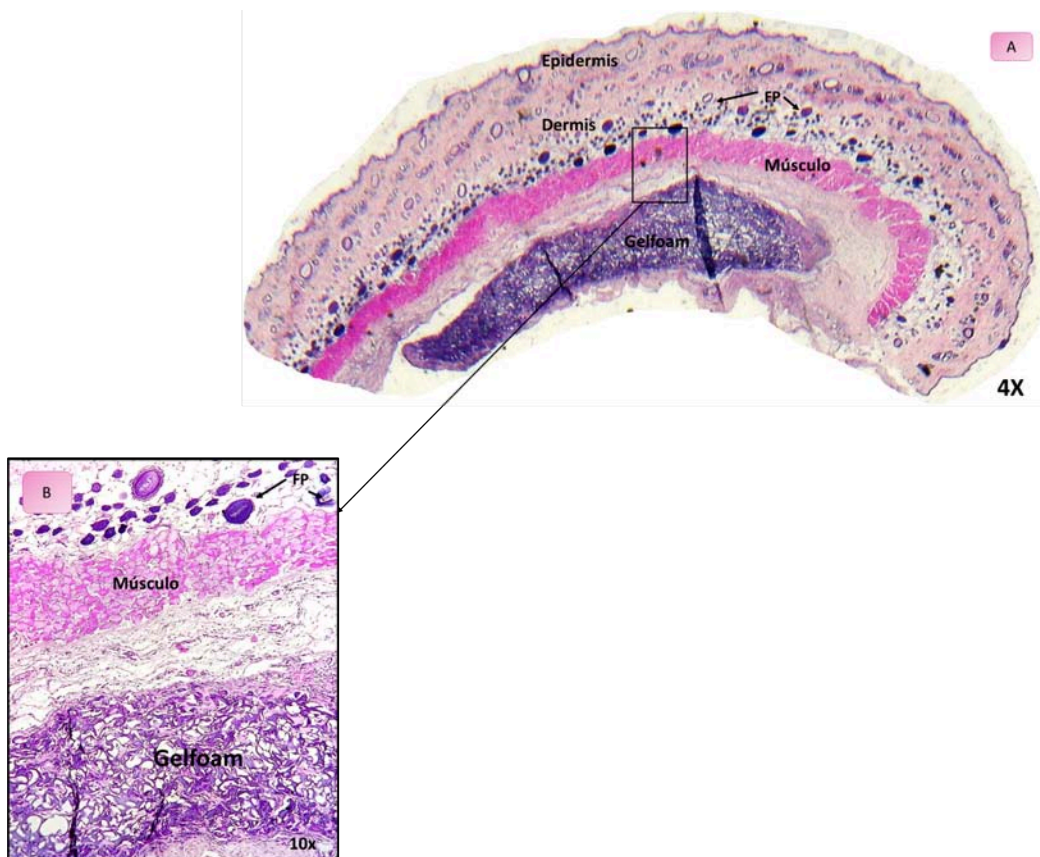


Figura 14 GELFOAM implantado en piel de rata a 21 días , teñida con H-E.

Figura A. Se muestra la fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de Folículos pilosos (TC) y sin alteraciones, al igual que el músculo. El biomaterial se encontró encapsulado por tejido fibroso.**Figura B.** Fotomicrografía a 10x, se observa la hipodermis, el músculo y Tejido Conectivo (TC) y el GELFOAM sin alteraciones

GELFOAM 60 días.

En el grupo de GELFOAM 60 días observamos que el biomaterial se reabsorbió por completo y ya solo se puede apreciar la piel de la rata.

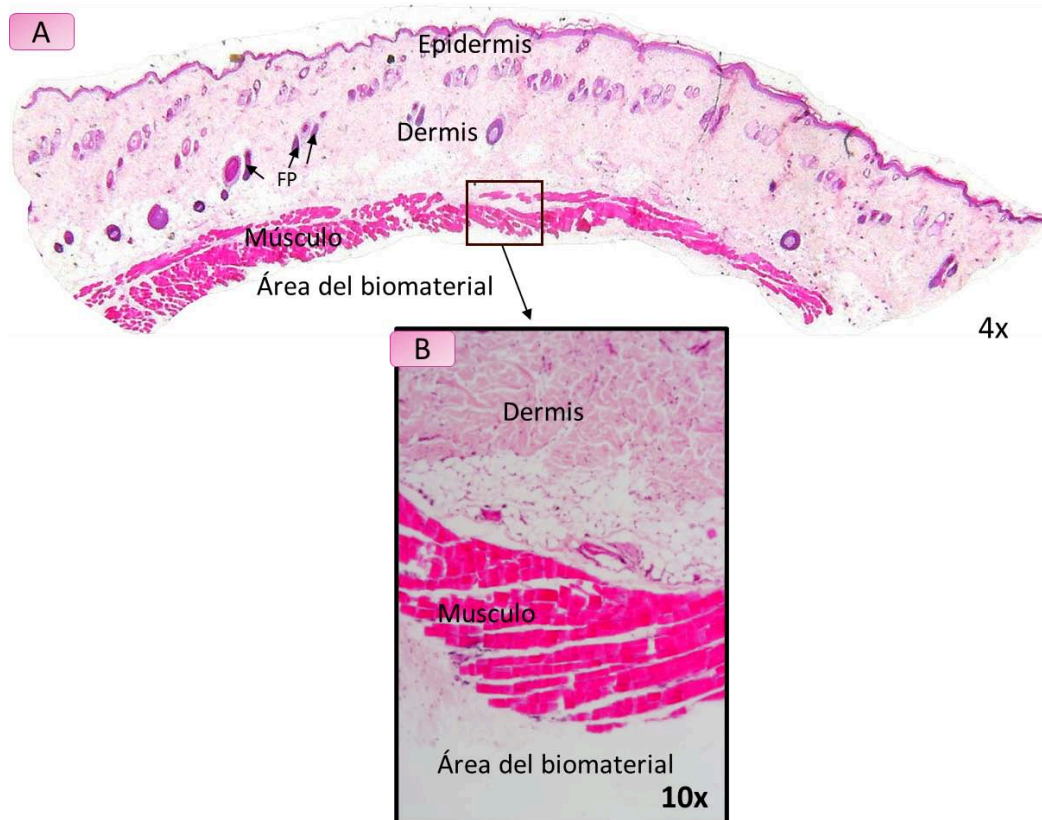


Figura 15 Gelfoam implantado en piel de rata a 60 días, teñida con H-E.

Figura A. Se muestra la fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. No se muestra rastros del biomaterial, el cual asumimos fue reabsorbido.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, se observa la hipodermis, el músculo y TC, sin aparentes alteraciones.

PLA 21 días.

En este grupo se aprecia el andamio integrándose al tejido conectivo y sin rechazo del mismo. no se observa inflamación.

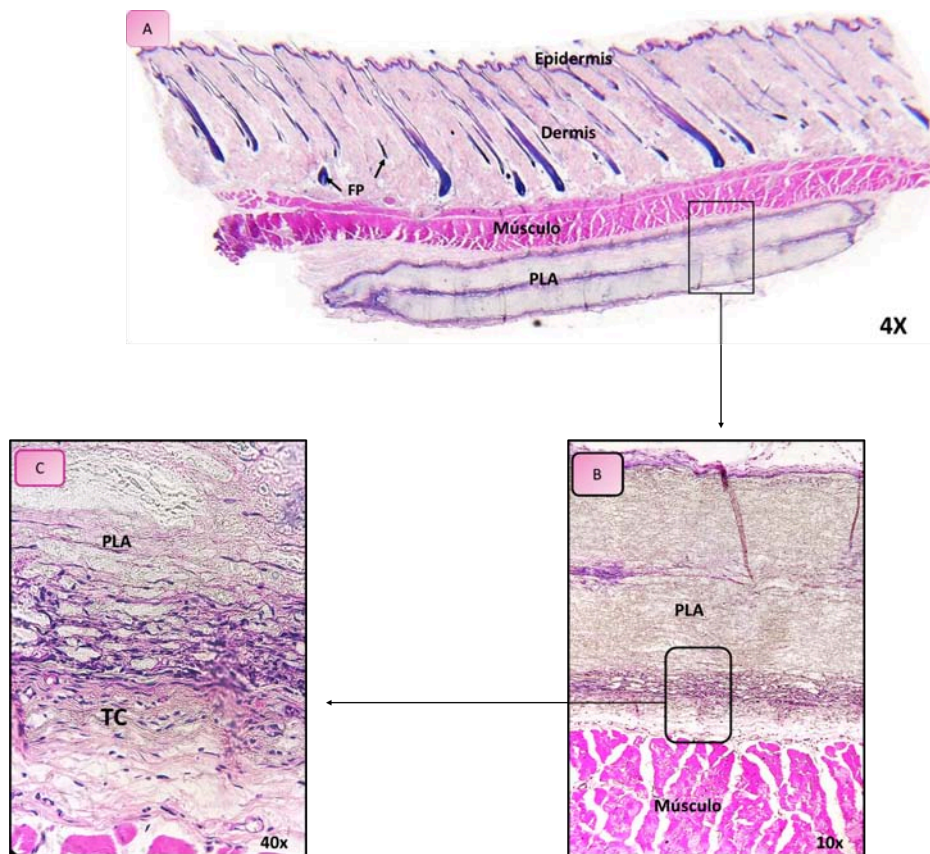


Figura 16 PLA implantado en piel de rata a 21 días , teñida con H-E.

Figura A. Se muestra en la fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración del PLA al TC y sin aparente rechazo.

Figura B. Podemos observar fotomicrografía a 10x, en donde el PLA está integrándose con el TC.

Figura C. Fotomicrografía a 40x, se observa con más detalle el tejido conectivo interactuando con el PLA.

PLA 60 días.

En este grupo se pueden apreciar aún con claridad las 3 capas de PLA integradas con el tejido conjuntivo y entre las capas se observa un abundante número de células.

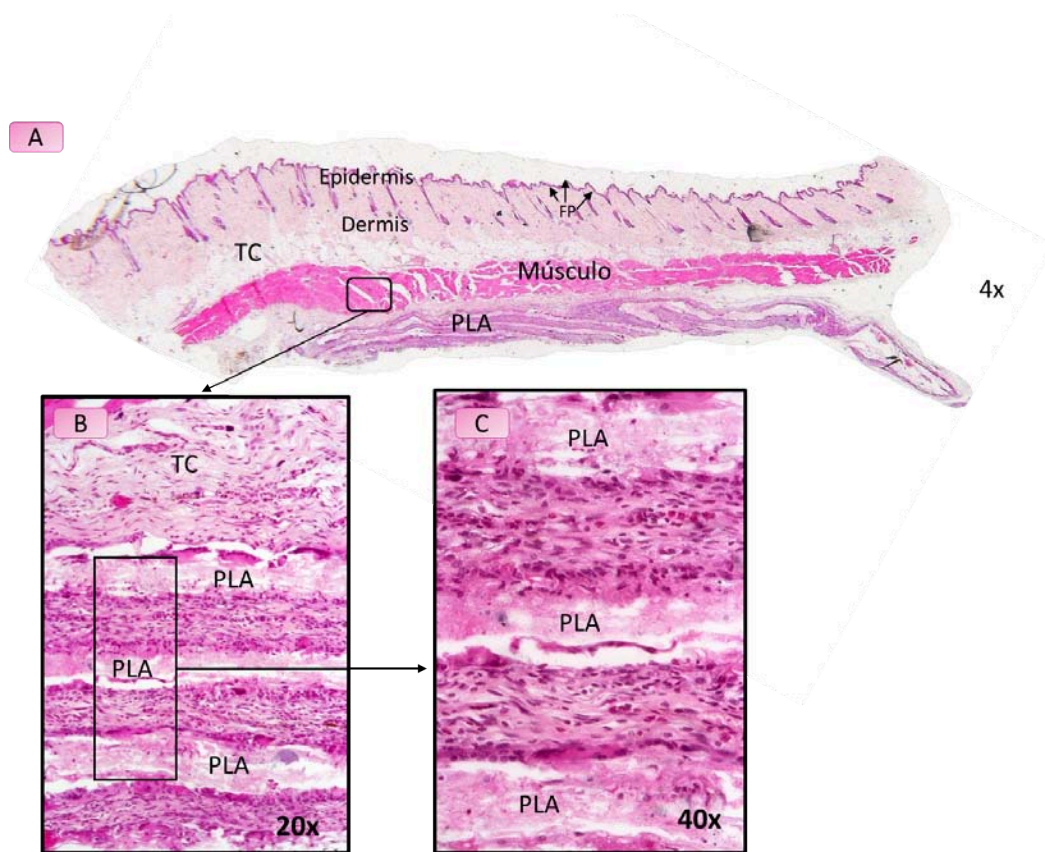


Figura 17 PLA implantado en piel de rata a 60 días , teñida con H-E.

Figura A. Se muestra en la fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración de las 3 capas de PLA al TC y sin aparente rechazo al PLA.

Figura B. Fotomicrografía a 20x, donde se puede observar las tres capas de PLA con el tejido conjuntivo.

Figura C. Fotomicrografía a 40x, podemos observar con más detalle la migración de las células, teniendo así la propiedad de biocompatibilidad.

PLA+MSCat 21 días.

En este grupo se puede apreciar con claridad las 3 capas de PLA+Mscat integradas con el tejido conjuntivo, se observa un gran número de células entre capa y capa del PLA.

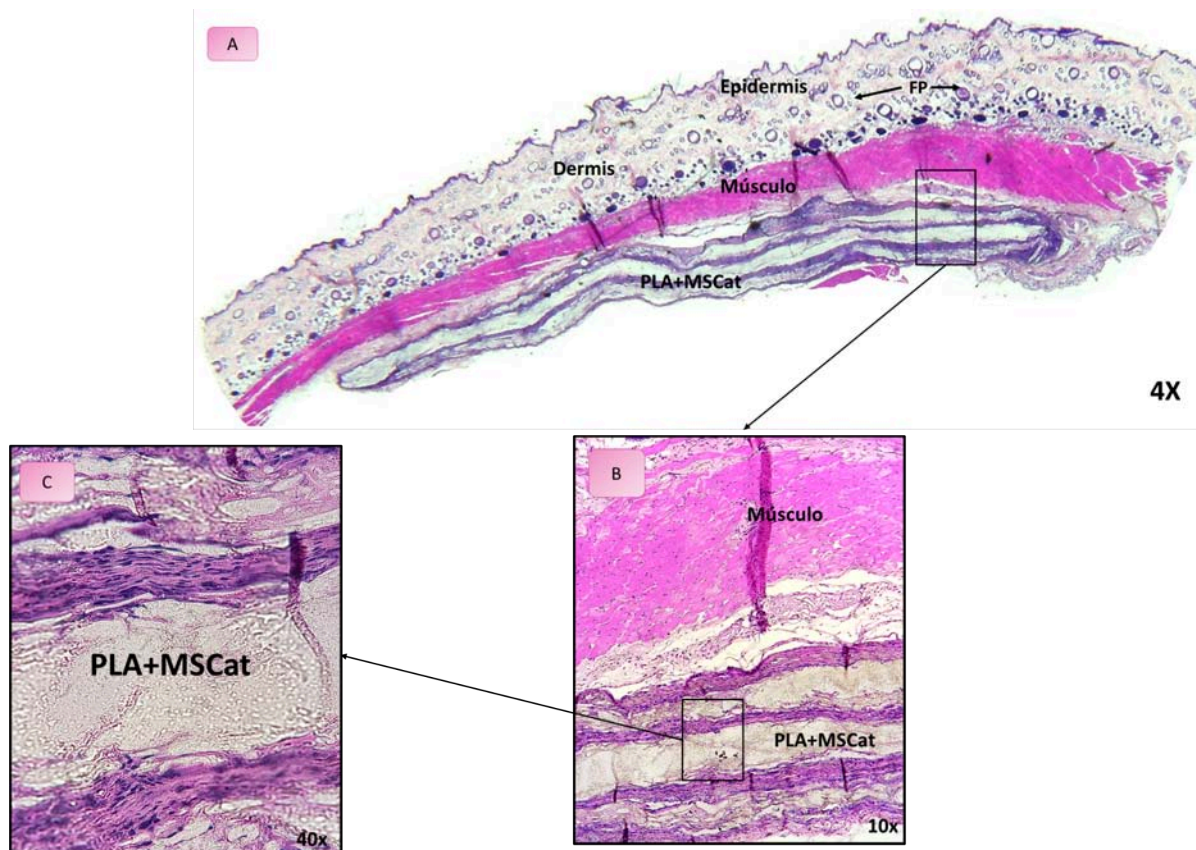


Figura 18 PLA+MSCat implantado en piel de rata a 21 días , teñida con H-E.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, se observa integrado con las 3 capas de PLA+MSCat y sin aparente rechazo al material, además de el músculo sin alteraciones.

Figura C. Fotomicrografía a 40x, donde podemos apreciar 2 capas del PLA+MSCat integradas con el tejido conjuntivo.

PLA+MSCat 60 días.

En este grupo se aprecia el constructo integrándose al tejido conectivo y sin rechazo del mismo.

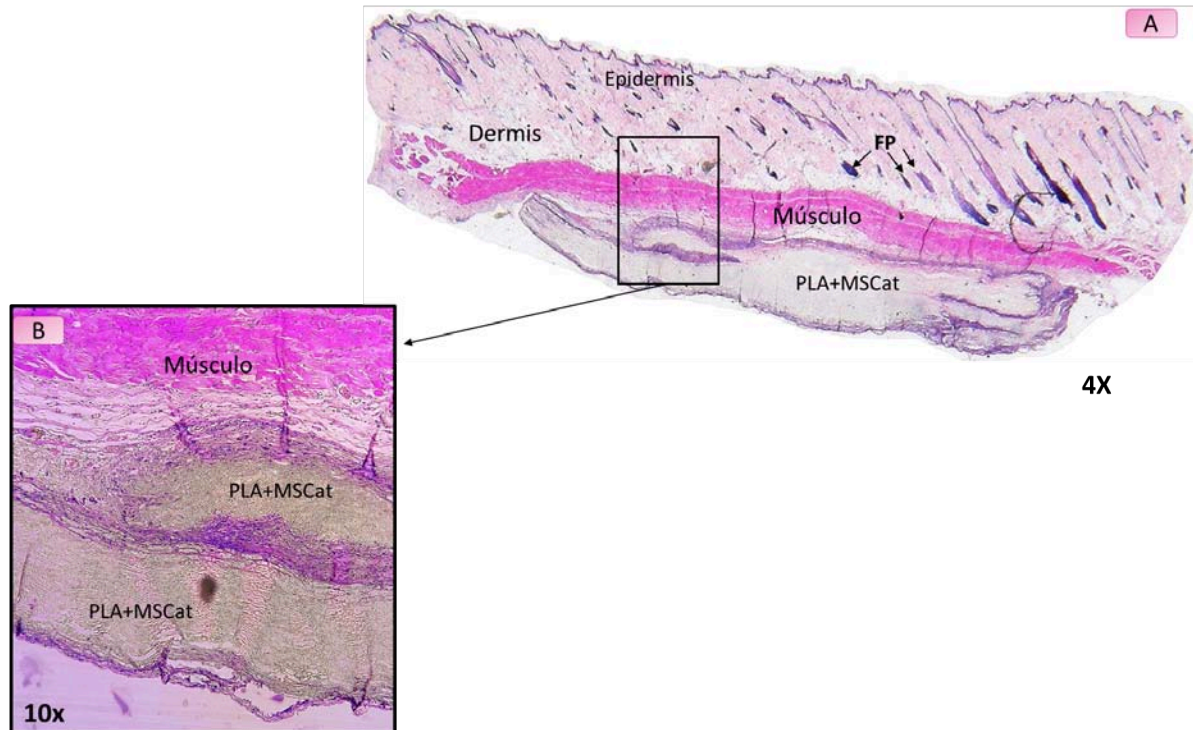


Figura 19 PLA+MSCat implantado en piel de rata a 60 días , teñida con H-E.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones. PLA+MSCat se observa integrado, no definido con las 3 capas y sin aparente rechazo al material.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde podemos observar 2 capas del PLA+MSCat con el tejido conjuntivo.

PLA+MSCost 21 días.

En este grupo se aprecia las capas del constructo integrándose al tejido conectivo y sin rechazo del mismo.

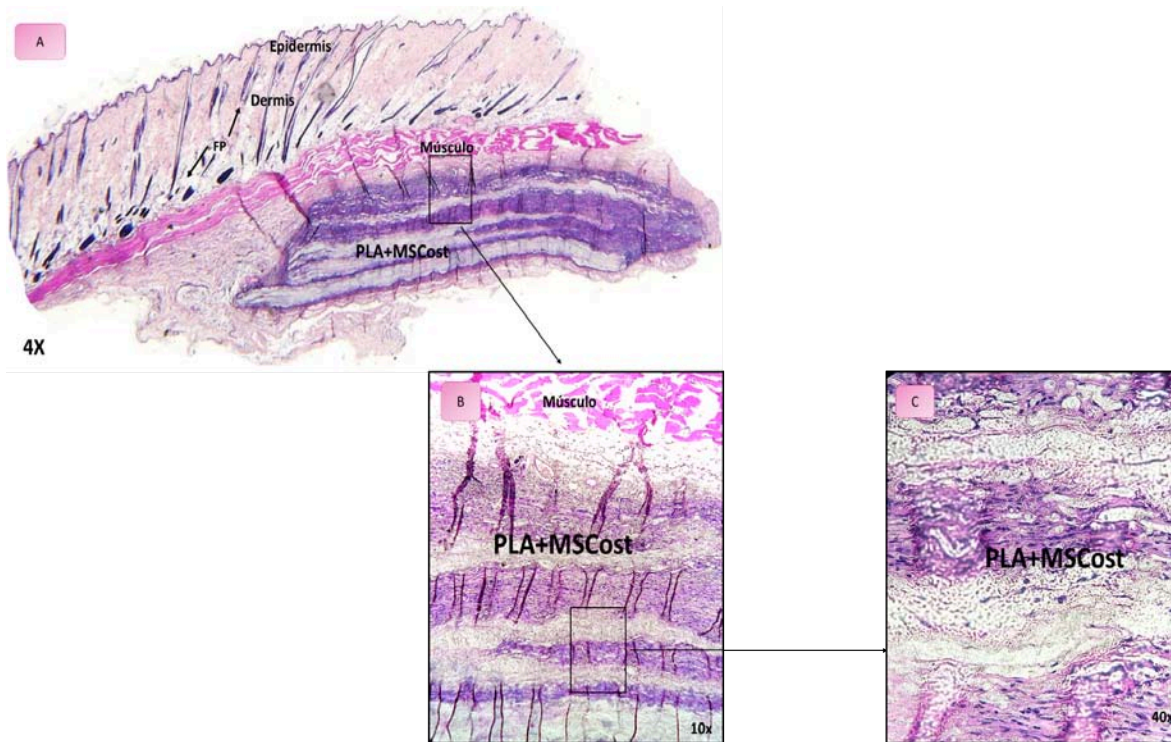


Figura 20 PLA+MSCost implantado en piel de rata a 21 días , teñida con H-E.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones. PLA+MSCost se observan las 3 capas del constructo y sin aparente rechazo al material.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde se observa, el músculo y la integración de las capas del constructo con respecto al tejido conectivo.

Figura C. Fotomicrografía a 40x, podemos observar con más detalle la migración de las células y la conformación del T.C, con respecto al constructo, teniendo así la propiedad de biocompatibilidad.

PLA + MSCost 60 días.

En este grupo se aprecia el constructo integrado al tejido conectivo y un gran número de células entre ellos.

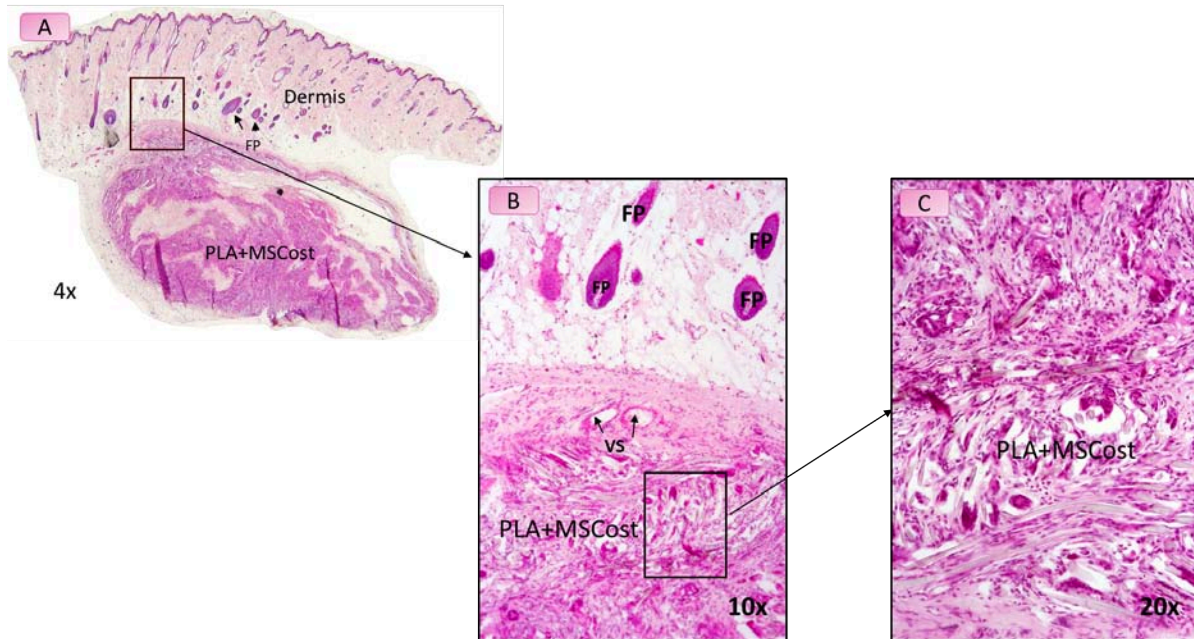


Figura 21 PLA+MSCost implantado en piel de rata a 60 días , teñida con H-E.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP (folículos pilosos) y sin alteraciones. PLA+MSCost se observa integrado, no definido con las 3 capas y sin aparente rechazo al constructo.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, se observa. la hipodermis con FP y 2 (vasos sanguíneos (VS) dando así una característica de buena inervación e integración.

Figura C. Fotomicrografía a 20x, donde se observa con más detalle la migración de las células y la conformación del T.C, teniendo así la propiedad de biocompatibilidad.

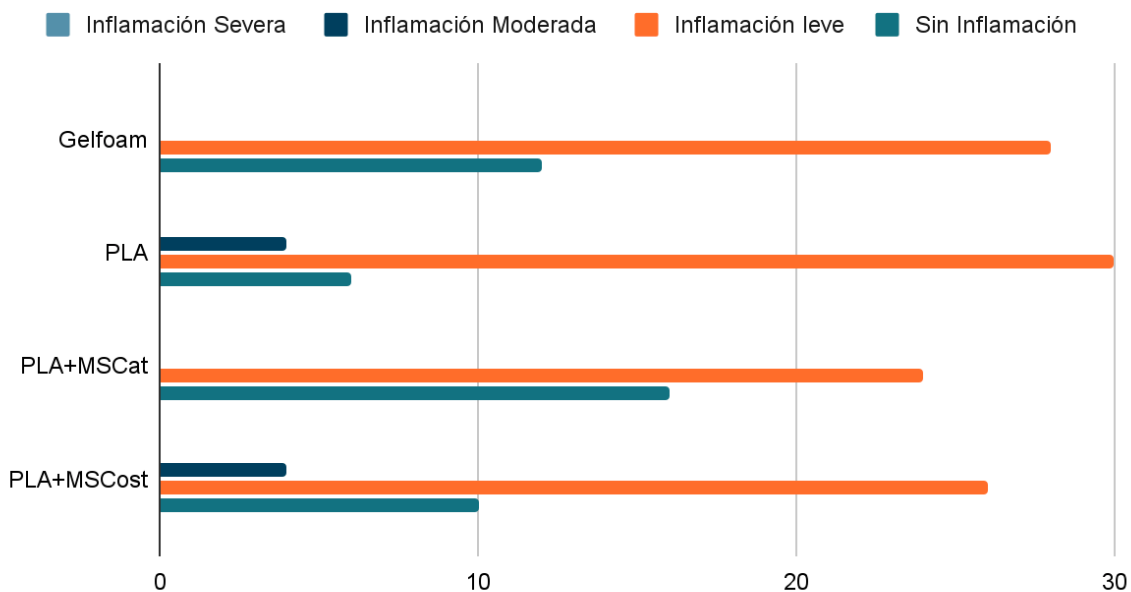
Control de Inflamación.

Para determinar nuestro segundo objetivo específico: “**Determinar si hay mineralización en el tejido o en el constructo, después de su implante en el tejido subcutáneo del dorso de la rata**”, realizamos el análisis de control de inflamación, donde buscamos evidenciar el nivel de inflamación que presentaron los especímenes en los grupos y tiempos de estudio, en un periodo de 20 días.

1º día.

Para el primer día después de la implantación, la mayoría de los especímenes presentaron leve en todos los grupos. **Gráfica 1.**

Inflamación 1º Día.

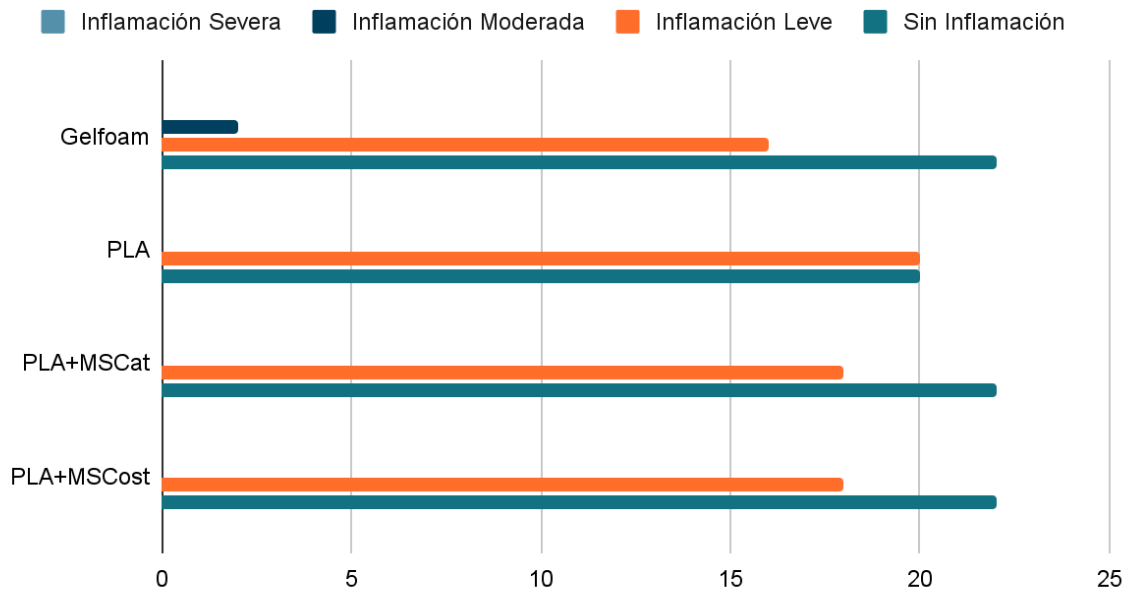


Gráfica 1 Niveles de inflamación 1º día. En el grupo **Gelfoam** el 70% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 30% inflamación Nula. En el grupo **PLA** el 79% de los especímenes presentaron una inflamación leve, el 16% inflamación nula y el 5% inflamación moderada. En el grupo **PLA+MSCat** el 60% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 40% inflamación nula. En el grupo de **PLA+MSCost** el 65% de los especímenes presentaron inflamación leve, el 25% inflamación nula y el 10% inflamación moderada.

3° día.

Para el tercer día después de la implantación, la mayoría de los especímenes presentaron leve en todos los grupos. **Gráfica 2.**

Inflamación 3° día.

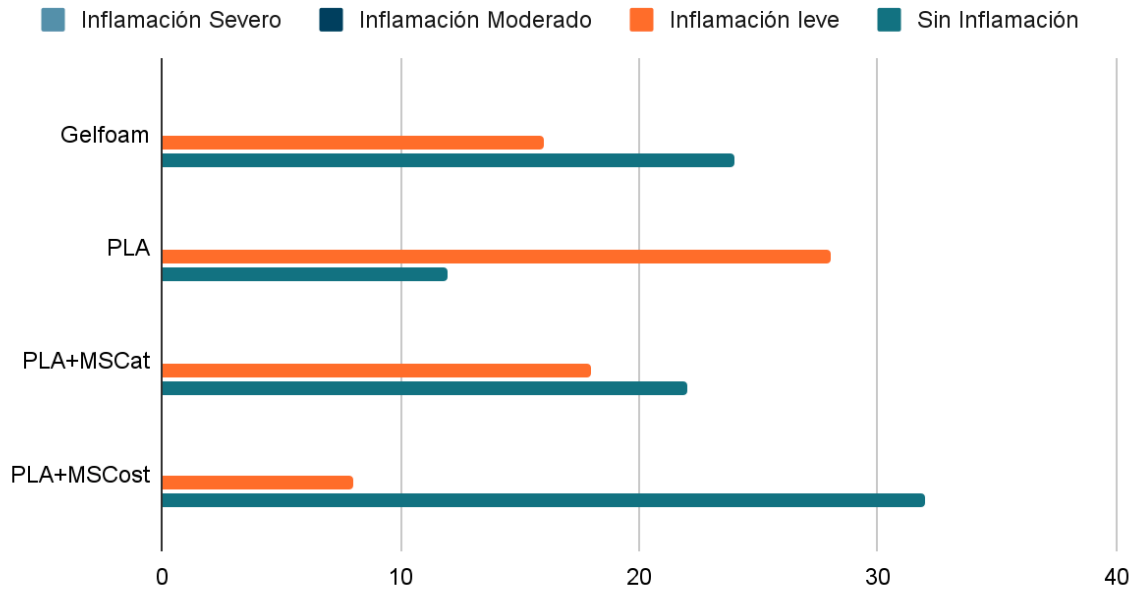


Gráfica 2 Niveles de inflamación 3° día. En el grupo **Gelfoam** el 40% de los especímenes presentaron una inflamación leve, el 5% inflamación moderada y el 55% inflamación nula. En el grupo **PLA** el 50% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 50% inflamación nula. En el grupo **PLA+MSCat** el 45% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 55% inflamación nula. En el grupo de **PLA+MSCost** el 43% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 55% inflamación nula.

5° día.

Para el quinto día después de la implantación, la mayoría de los especímenes presentaron inflamación leve (ver **Gráfica 3**).

Inflamación 5° día.

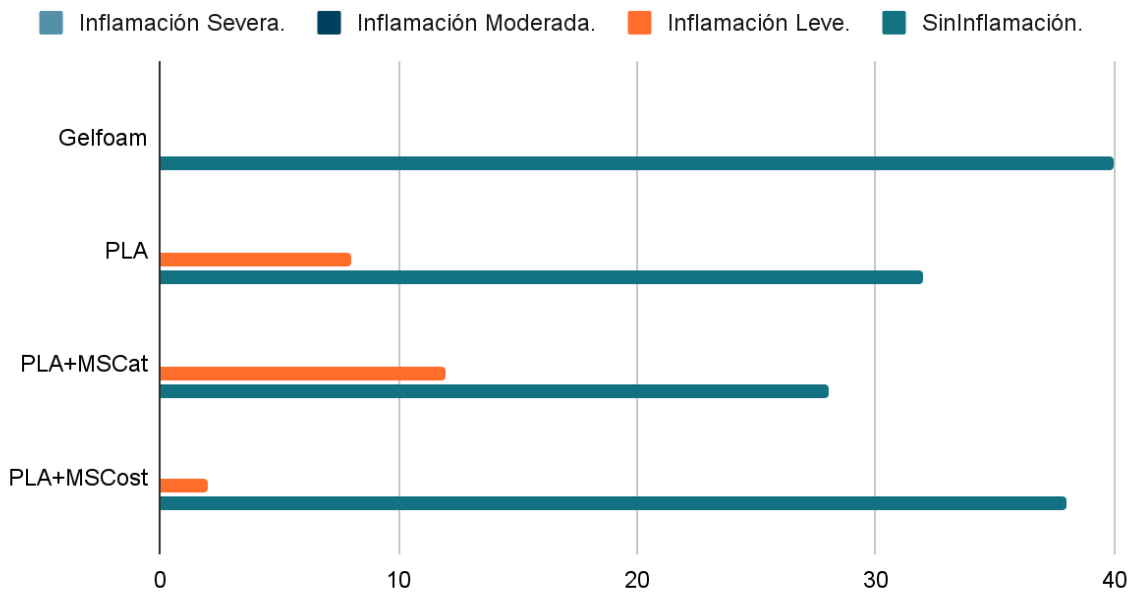


Gráfica 3 Niveles de inflamación 5° día. En el grupo **Gelfoam** el 40% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 6% inflamación nula. En el grupo **PLA** el 70% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 30% inflamación nula. En el grupo **PLA+MSCat** el 45% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 55% inflamación nula. En el grupo de **PLA+MSCost** el 20% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 80% inflamación nula.

7° día.

Para el séptimo día después de la implantación, la mayoría de los especímenes no presentaron inflamación en los grupos, teniendo como resultado nula inflamación severa. **Gráfica 4.**

Inflamacion 7° día.



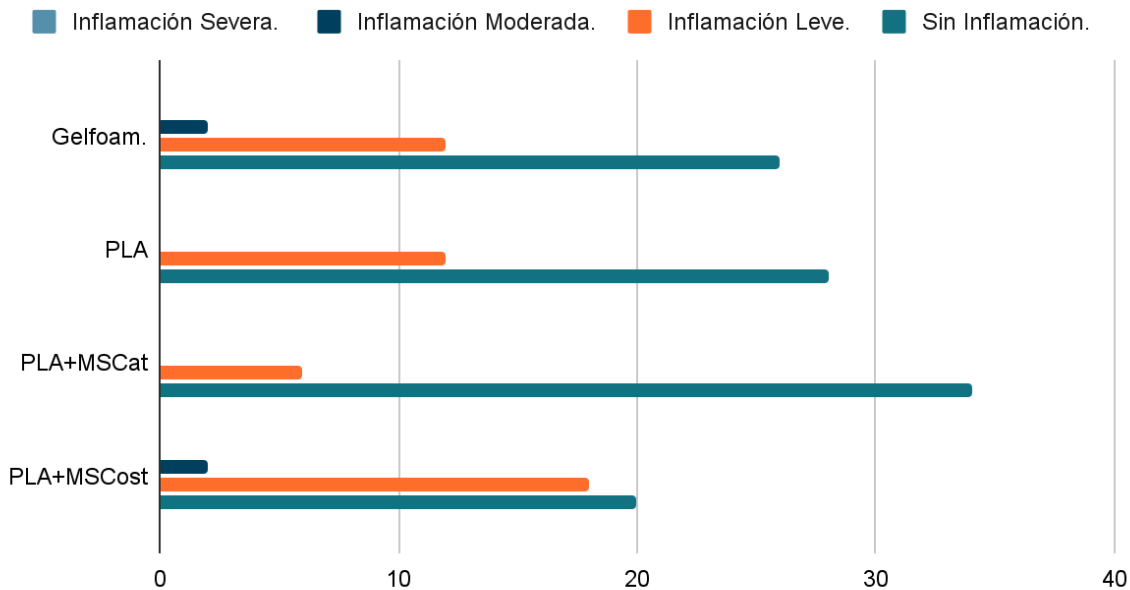
Gráfica 4 Niveles de inflamación 7° día. En el grupo **Gelfoam** el 100% de los especímenes presentaron una inflamación nula. En el grupo **PLA** el 21% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 79% inflamación nula. En el grupo **PLA+MSCat** el 30% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 70% inflamación nula. En el grupo de **PLA+MSCost** el 5% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 95% inflamación nula.

10° día.

Para el décimo día después de la implantación, la mayoría de los especímenes no presentaron inflamación y leve en todos los grupos, teniendo como resultado nula inflamación severa.

Gráfica 5.

Inflamación 10° día.

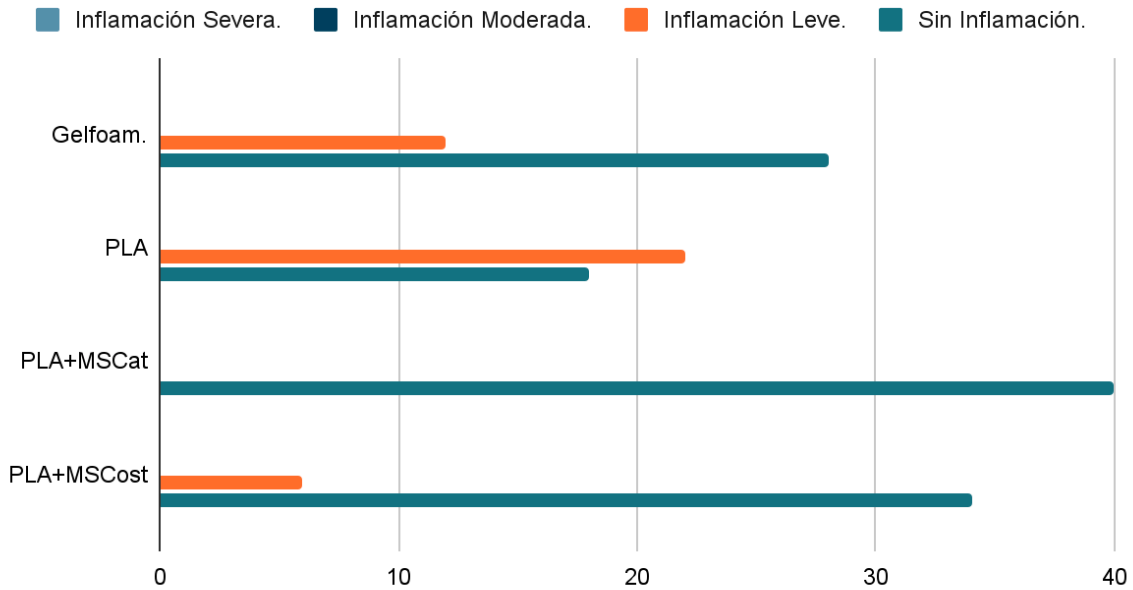


Gráfica 5 Niveles de inflamación 10° día. En el grupo **Gelfoam** el 26% de los especímenes presentaron una inflamación leve, el 5% inflamación moderada y el 69% inflamación nula. En el grupo **PLA** el 33% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 67% inflamación nula. En el grupo **PLA+MSCat** el 16% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 84% inflamación nula. En el grupo de **PLA+MSCost** el 47% de los especímenes presentaron inflamación leve, el 5% de inflamación moderada y el 48% inflamación nula.

15° día.

Para el décimo quinto día después de la implantación, la mayoría de los especímenes presentaron inflamación nula en todos los grupos, teniendo como resultado nula inflamación severa. **Gráfica 6.**

Inflamación 15° día.

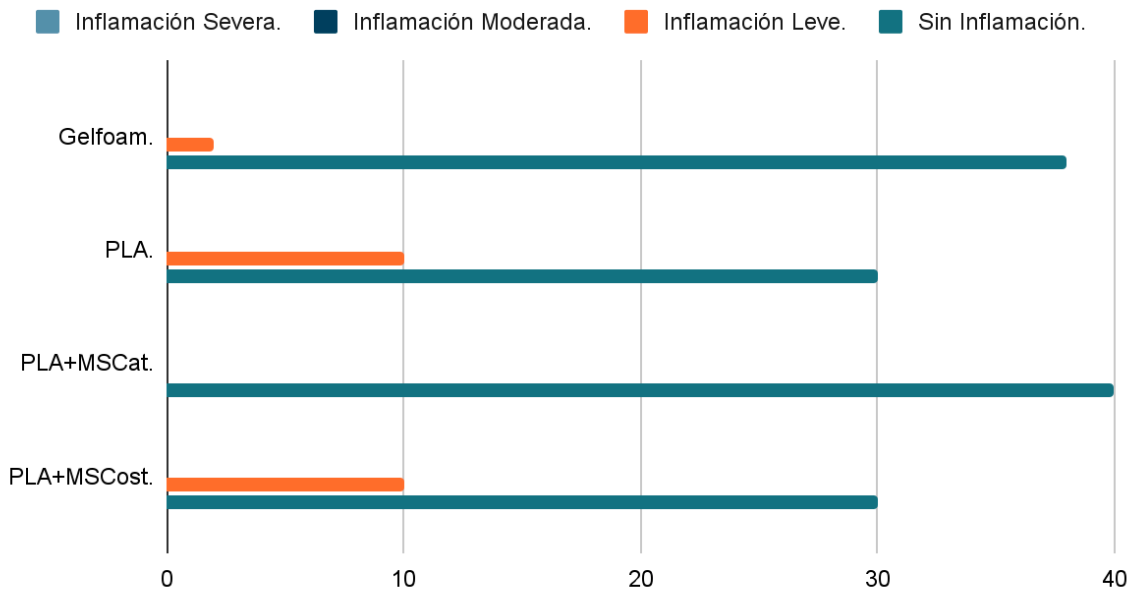


Gráfica 6 Niveles de Inflamación 15° día. En el grupo **Gelfoam** el 32% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 68% inflamación nula. En el grupo **PLA** el 53% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 47% inflamación nula. En el grupo **PLA+MSCat** el 100% de los especímenes presentaron inflamación nula. En el grupo de **PLA+MSCost** el 16% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 84% inflamación nula.

20° día.

Para el vigésimo día después de la implantación, la mayoría de los especímenes presentaron inflamación nula y leve en todos los grupos, teniendo como resultado nula inflamación severa. **Gráfica 7.**

Inflamación 20° día.



Gráfica 7 Niveles de inflamación 20° día. En el grupo de **Gelfoam** el 5% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 95% inflamación Nula. En el grupo **PLA** el 26% de los especímenes presentaron una inflamación leve y el 74% inflamación Nula. En el grupo **PLA+MSCat** el 100% de los especímenes presentaron inflamación nula. En el grupo de **PLA+MSCost** el 26% de los especímenes presentaron inflamación leve y el 74% inflamación nula.

Tricrómico de Masson TM.

Para determinar nuestro tercer objetivo específico: “Determinar si hay mineralización en el tejido o en el constructo, después de su implante en el tejido subcutáneo del dorso de la rata”, realizamos el análisis Histológico de TM, en donde evidenciamos que en los constructos realizados se observó abundantes fibras de colágeno que podrían ser indicativo de formación de hueso. De manera general observamos que en los constructos y en el andamio, eran mayor las fibras de colágeno, además que entre sus capas existían abundantes células y una buena interacción con el TC.

En el grupo de GELFOAM 21 días existían fibras de colágeno, pero de menor existencia a comparación que en el grupo de los constructos y andamio. En el grupo de GELFOAM 60 días, el biomaterial se absorbió por completo.

GELFOAM 21 días.

Se puede observar el biomaterial encapsulado entre fibras de colágeno.

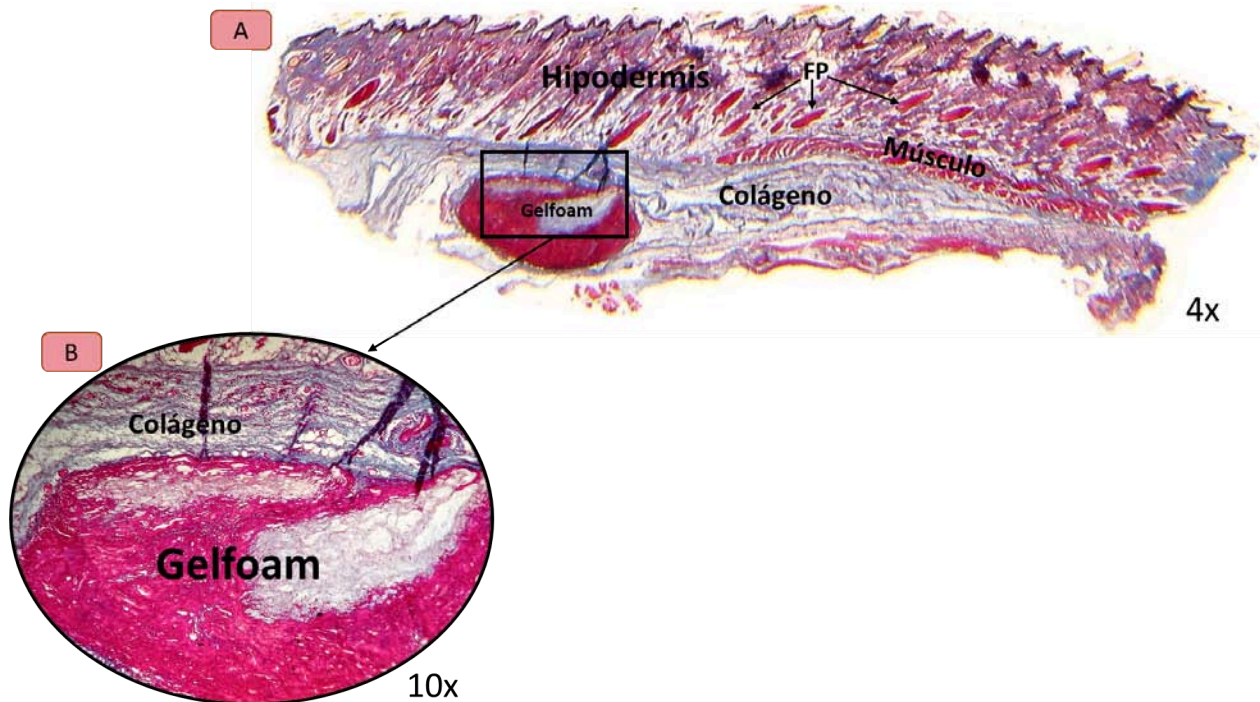


Figura 22 GELFOAM implantado en piel de rata a 21 días , teñida con TM.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración del Gelfoam al TC, sin aparente rechazo, además de una red de colágeno rodeando el biomaterial.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde podemos observar el músculo sin alteraciones y la integración del GELFOAM con el TC y fibras de colágeno rodeando el biomaterial.

GELFOAM 60 días.

Solo se puede apreciar la piel de la rata debido a que el biomaterial fue reabsorbido en su totalidad, como era esperado.

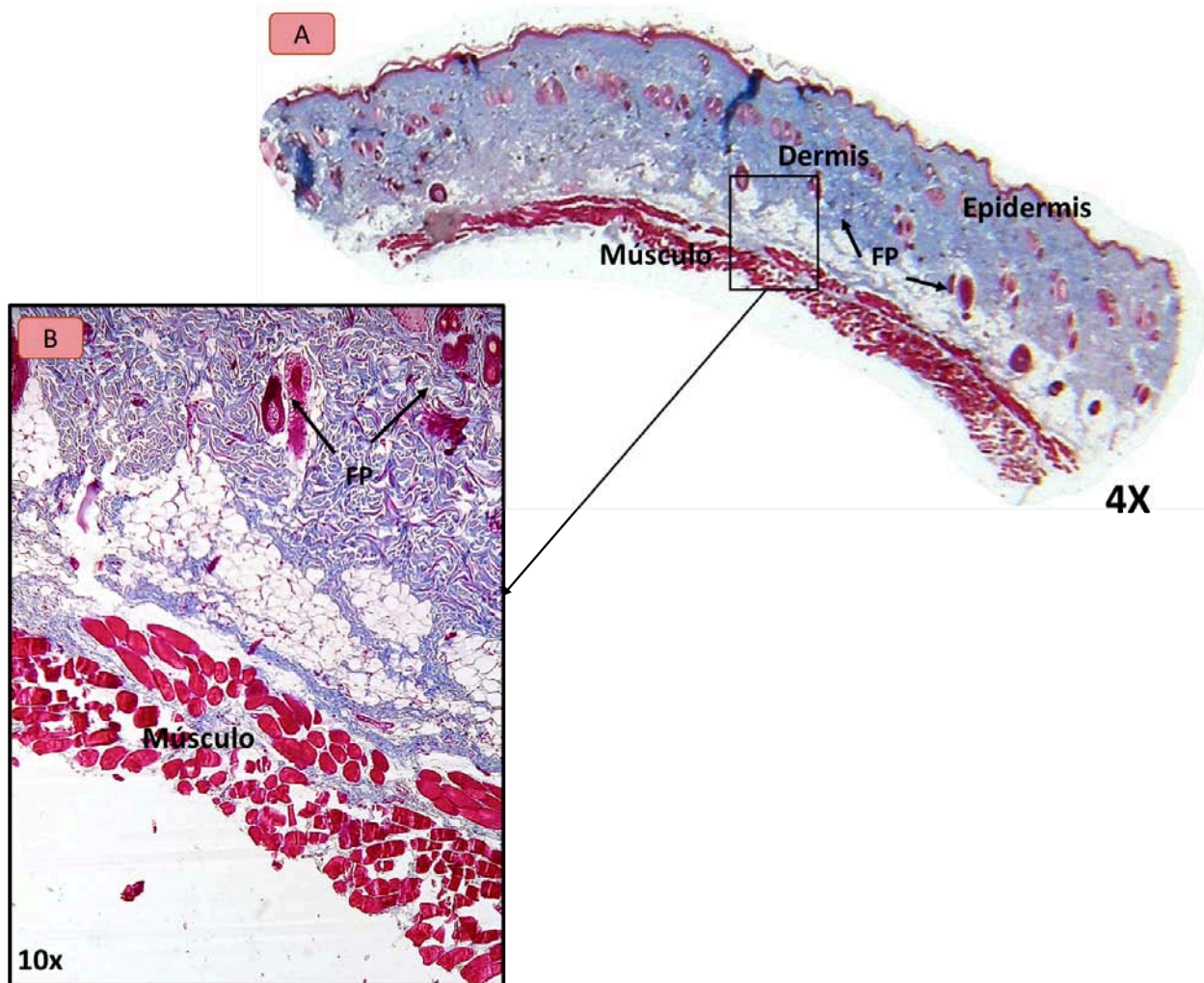


Figura 23 GELFOAM implantado en piel de rata a 60 días , teñida con TM.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. No se muestran rastros del biomaterial, el cual asumimos fue reabsorbido.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde se observa la dermis y el músculo sin alteraciones, además de algunos folículos pilosos y sin rastro del biomaterial.

PLA 21 días.

En este grupo se aprecia el andamio integrándose al tejido conectivo y fibras de colágeno rodeando el andamio.

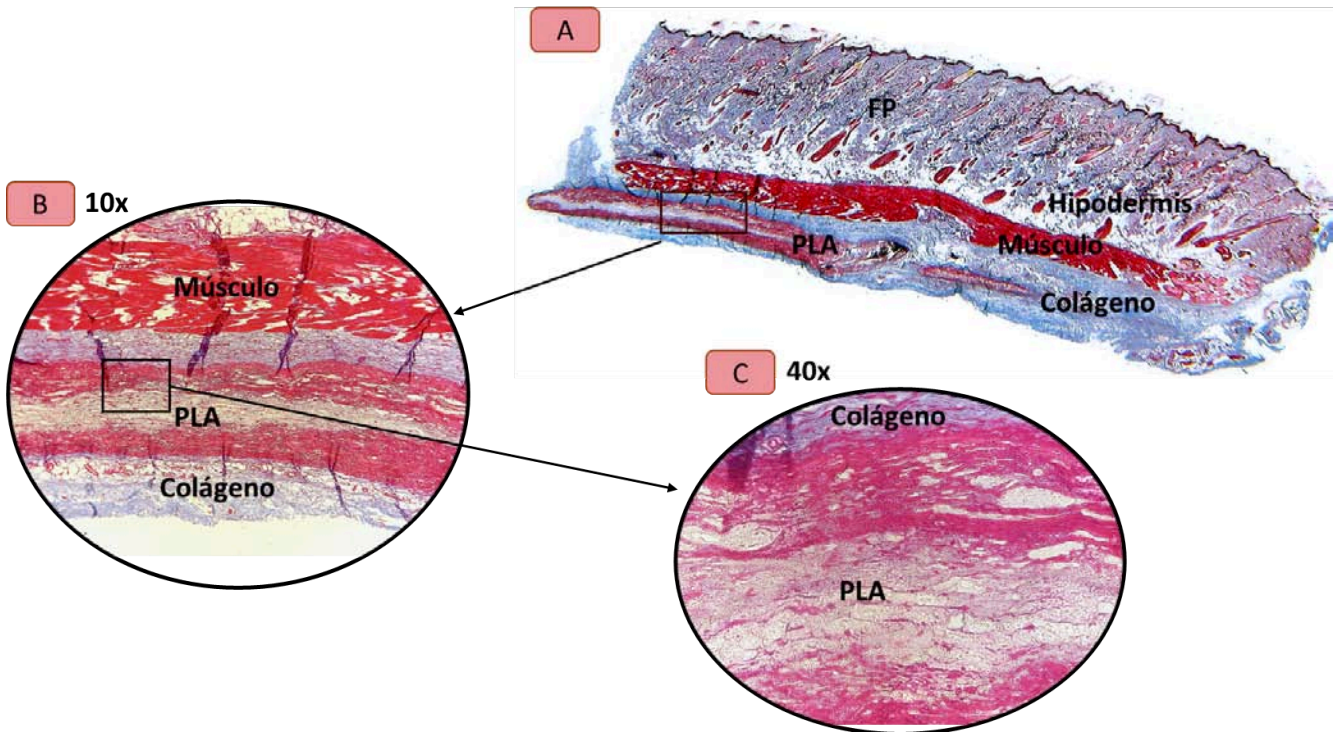


Figura 24 PLA implantado en piel de rata a 21 días , teñida con TM.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración del PLA al TC, sin aparente rechazo al andamio, además de una red de colágeno rodeándolo.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde podemos observar el músculo sin alteraciones y la integración del PLA con el TC.

En la Figura C. Fotomicrografía a 40x, donde se observa con más detalle la integración del PLA con el TC.

PLA 60 días.

En este grupo se puede apreciar con claridad las 3 capas de PLA integradas con el tejido conjuntivo, además se observa entre el tejido y el andamio una capa de colágeno.

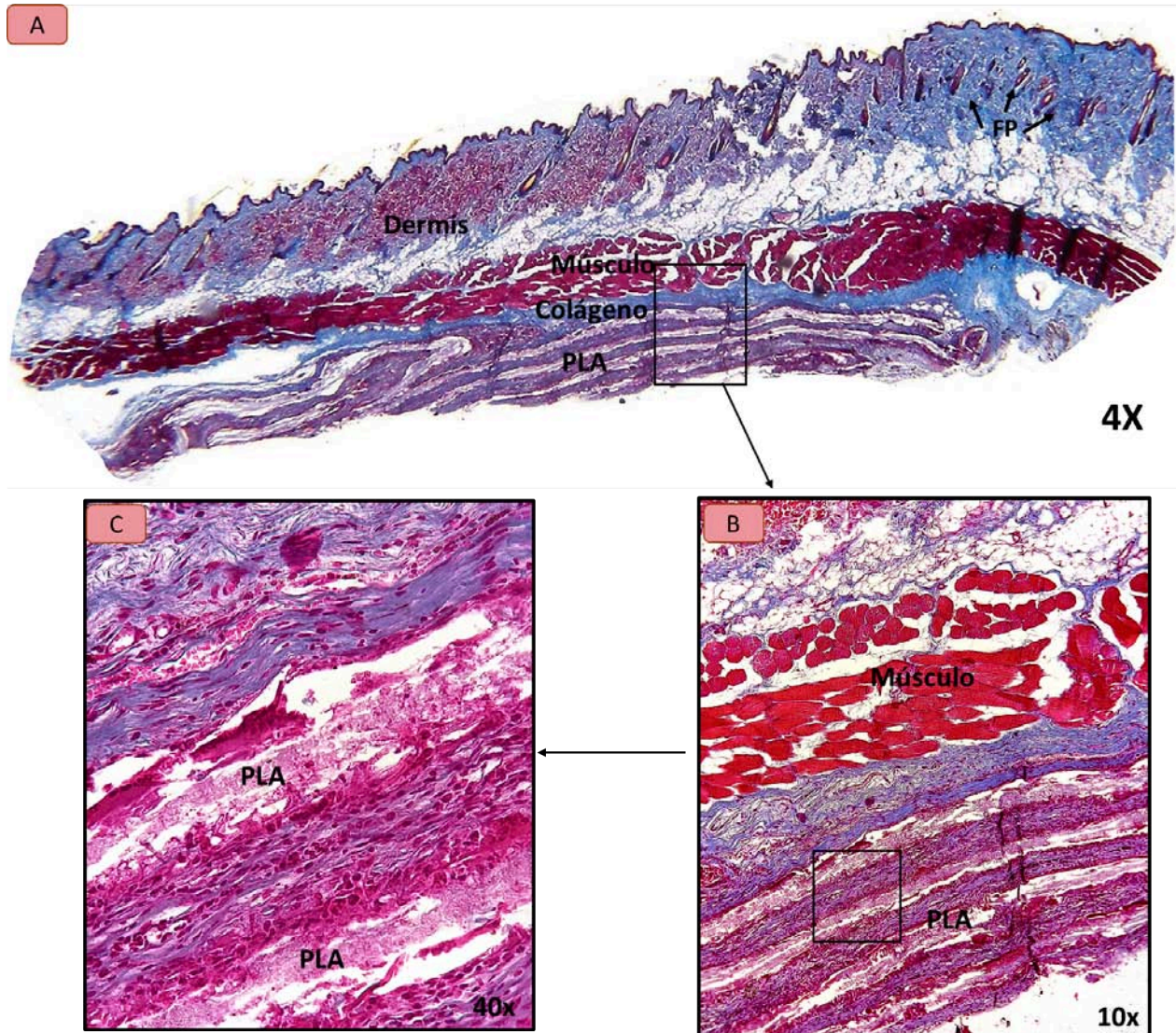


Figura 25 PLA implantado en piel de rata a 60 días , teñida con TM.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración del PLA y sus tres con el TC, sin aparente rechazo y algunas redes de colágeno rodeando la parte superior del andamio.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde se aprecia el músculo sin alteraciones y la integración de las 3 capas de PLA con el TC.

Figura C. Fotomicrografía a 40x, donde podemos observar con más detalle la integración de 2 capas de PLA con el TC.

PLA+MSCat 21 días.

En este grupo se puede apreciar con claridad las capas de PLA+MSCat integradas con el tejido conjuntivo, además se observa una capa de colágeno rodeando el constructo.

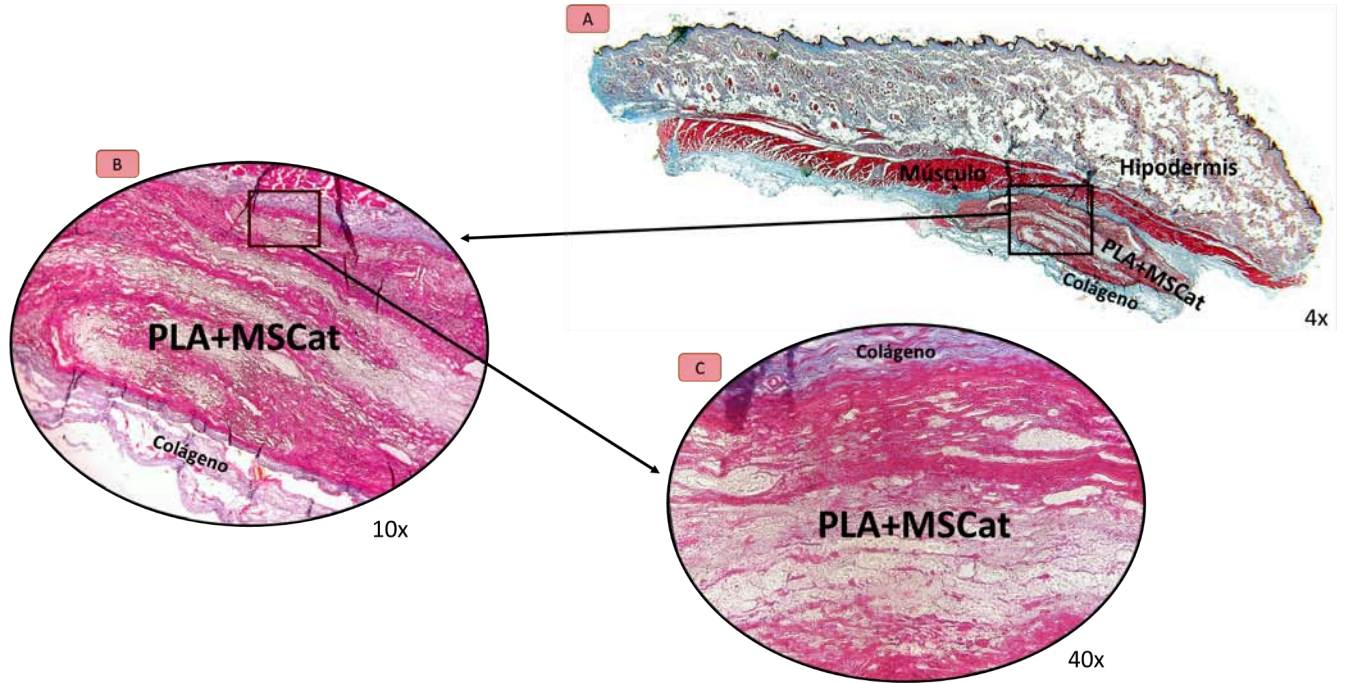


Figura 26 PLA+ MSCat implantado en piel de rata a 21 días , teñida con TM.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración del PLA+MSCat al TC, sin aparente rechazo al constructo y además una red de colágeno rodeándolo.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde se aprecia la integración del constructo con el TC y la red de colágeno

Figura C. Fotomicrografía a 40x, se observa con más detalle la integración del constructo con el TC.

PLA+MSCat 60 días.

En este grupo se aprecia el constructo integrado al tejido conectivo y fibras de colágeno entre el constructo y el tejido.

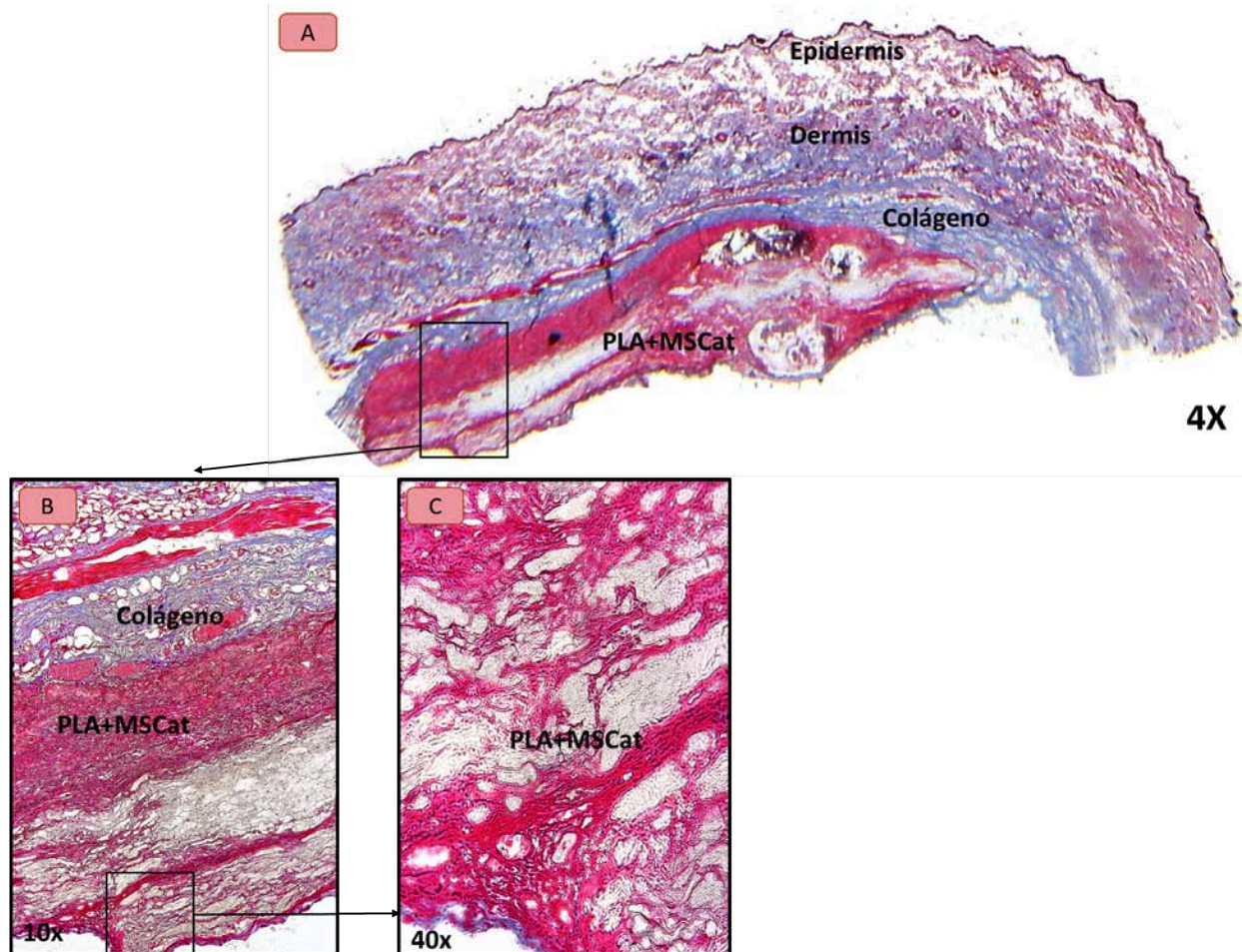


Figura 27 PLA+ MSCat implantado en piel de rata a 60 días , teñida con TM.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración del PLA+MSCat al TC, sin aparente rechazo, no se diferencian las capas del constructo y además una red de colágeno rodeando el constructo.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde se observa la integración del andamio con el TC y la red de colágeno rodeando la parte superior del constructo.

Figura C. Fotomicrografía a 40x, donde podemos observar con más detalle la integración del constructo con el TC.

PLA+MSCost 21 días.

En este grupo se aprecia el constructo integrado al tejido conectivo y fibras de colágeno rodeando el constructo.

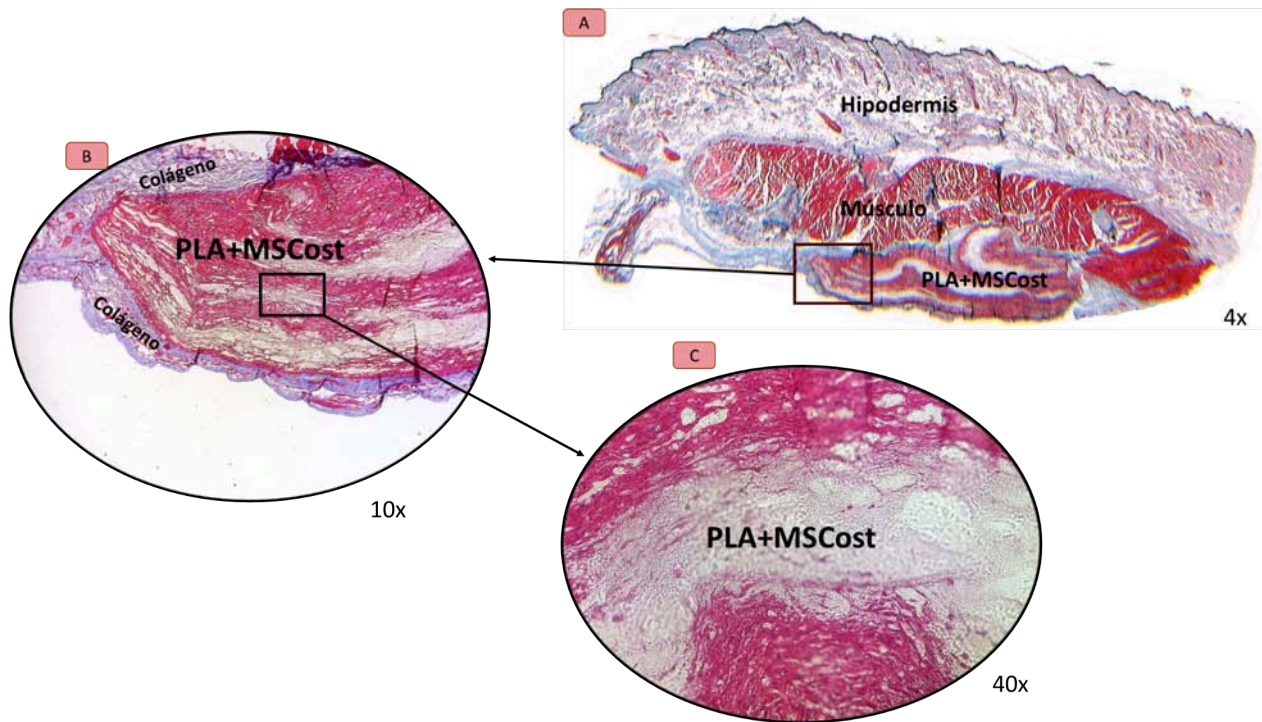


Figura 28 PLA+ MSCost implantado en piel de rata a 21 días , teñida con TM.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración del PLA+MSCost al TC, sin aparente rechazo y además una red de colágeno rodeando el constructo.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde se aprecia la integración del constructo con el TC y la red de colágeno rodeándolo.

Figura C. Fotomicrografía a 40x, donde podemos observar con más detalle la integración del constructo con el TC.

PLA+MSCost 60 días.

En este grupo se aprecia el constructo integrado al tejido conectivo y fibras de colágeno entre el constructo y el tejido.

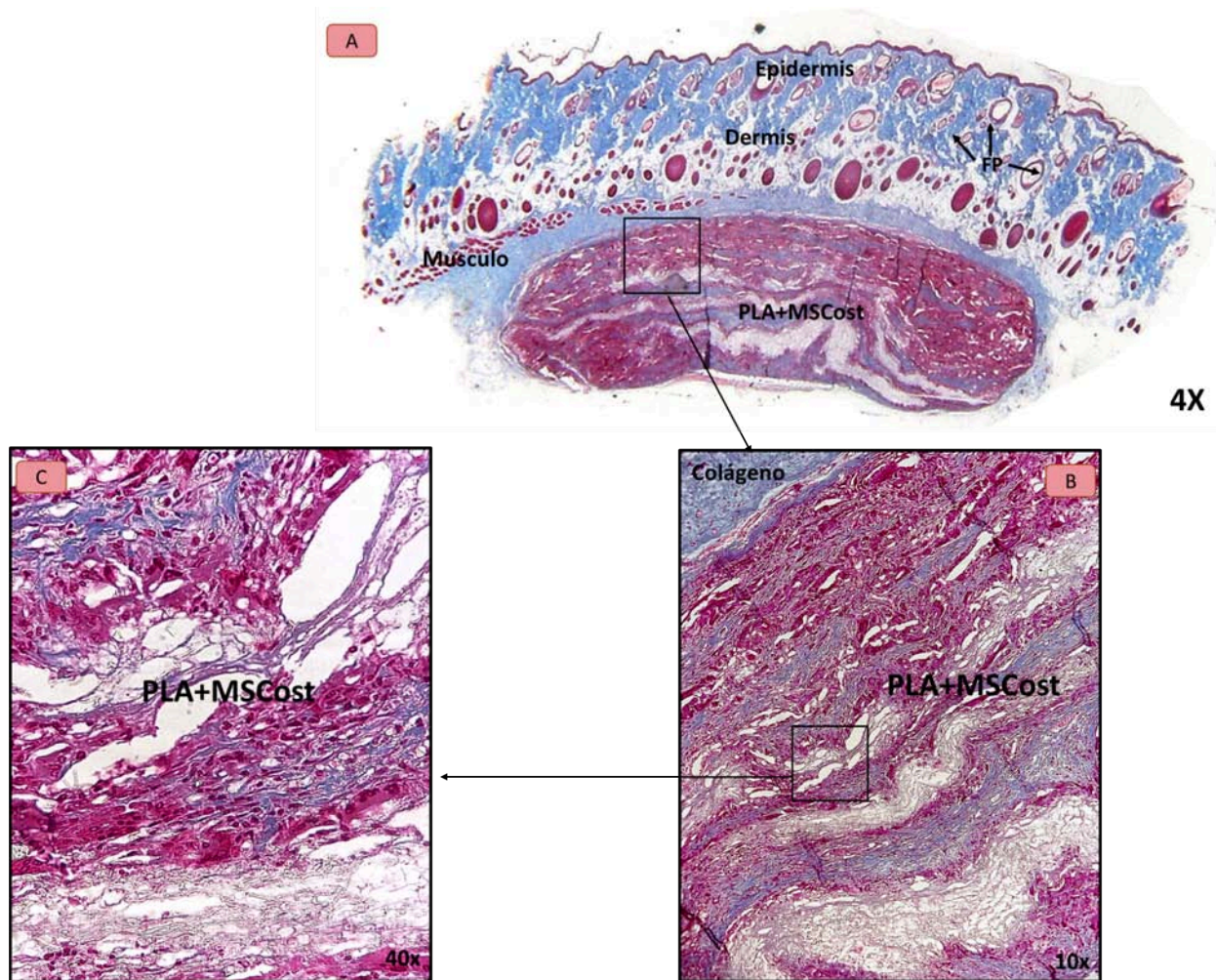


Figura 29 PLA+ MSCost implantado en piel de rata a 60 días , teñida con TM.

Figura A. Se muestra fotomicrografía a 4x, en donde podemos observar, la epidermis y la dermis con abundante presencia de FP y sin alteraciones, al igual que el músculo. La integración del PLA+MSCost (sin diferenciarse las capas del constructo) al TC, sin aparente rechazo y además una red de colágeno rodeando el constructo.

Figura B. Fotomicrografía a 10x, donde se observa la integración del constructo con el TC y la red de colágeno rodeando la parte superior de este.

Figura C. Fotomicrografía a 40x, donde se aprecia con más detalle la integración del constructo con el TC.

Von Kossa.

Para determinar nuestro tercer objetivo específico: “**Determinar si hay mineralización en el tejido o en el constructo, después de su implante subdérmico**”, realizamos el análisis Histológico de VK, en donde buscamos evidenciar depósitos de calcio en nuestros constructos.

En este análisis comprobamos que en todos los grupos y tiempos de estudio no se presentaron depósitos de calcio, comparándolo con el control positivo (Mandíbula de Rata).

21 días.

En las siguientes imágenes se muestran los resultados de la prueba de Von Kossa a los grupos de 21 días para demostrar depósitos de calcio en dichas muestras, las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico invertido a 10x, en donde se demuestra que los grupos de nuestro estudio fueron negativos, comparándolos con el control positivo.

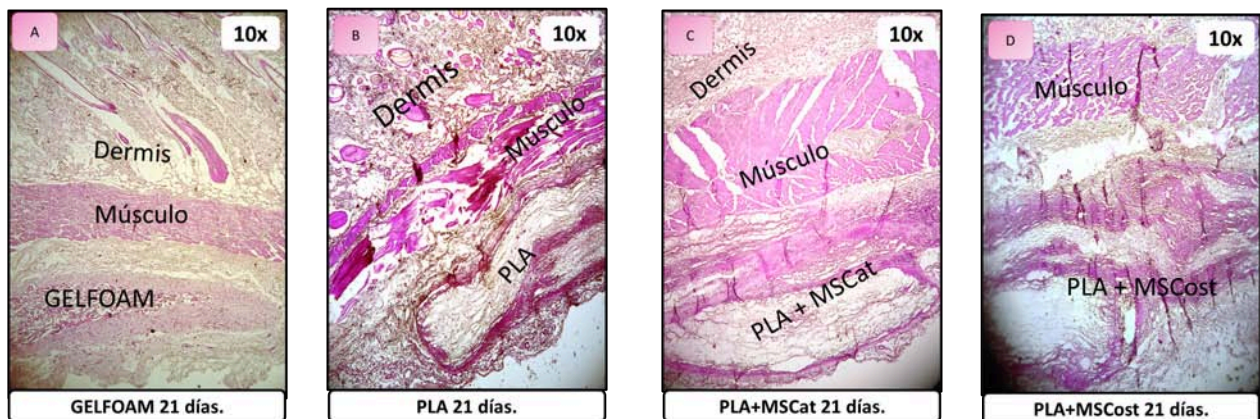


Figura 30 Fotomicrografías de los grupos del tiempo de estudio de 21 días, a 10x (GELFOAM, PLA, PLA+MSCat y PLA+MSCost) teñidas con VK.

Figura A. Fotomicrografía de GELFOAM 21 días, a 10x, se aprecia el biomaterial encapsulado por tejido fibroso, se muestra negativo a la tinción de VK

Figura B. Fotomicrografía de PLA 21 días, a 10x, podemos observar el andamio integrado con el tejido conectivo, sin embargo se muestra negativo a la tinción de VK.

Figura C. Fotomicrografía de PLA+MSCat 21 días, a 10x, se observa el constructo integrado con el tejido conectivo, sin embargo se muestra negativo a la tinción de VK.

Figura D. Fotomicrografía de PLA+MSCost a 21 días, se puede apreciar el constructo integrado con el tejido conectivo, sin embargo se muestra negativo a la tinción de VK.

60 días.

En las siguientes imágenes se muestran los resultados de la prueba de Von Kossa a los grupos de 60 días para demostrar depósitos de calcio en dichas muestras, las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico invertido a 10x, en donde se demuestra que los grupos de nuestro estudio fueron negativos, comparándolos con el control positivo.

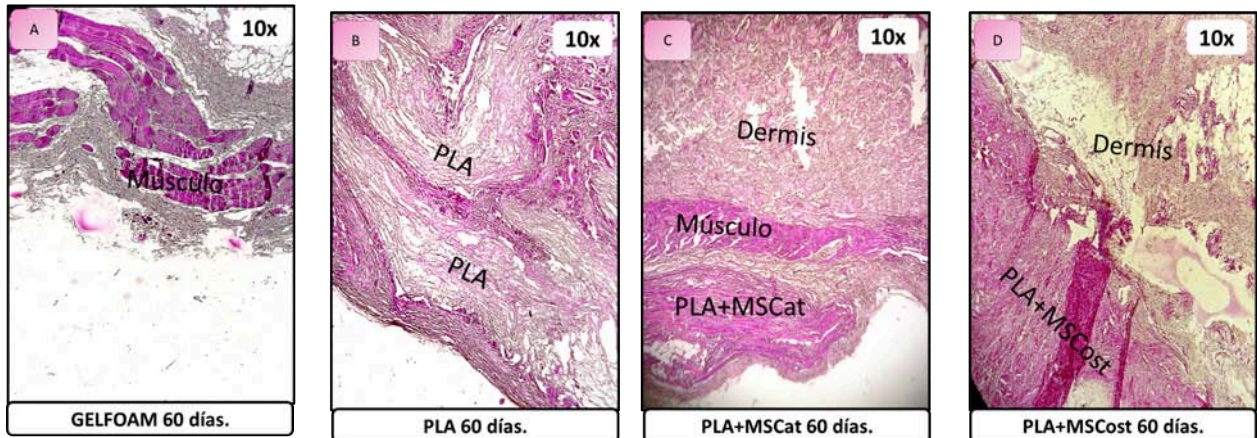


Figura 31 Fotomicrografías de los grupos del tiempo de estudio de 60 días, a 10x (GELFOAM, PLA, PLA+MSCat y PLA+MSCost) teñidas con VK.

Figura A. Fotomicrografía de GELFOAM 60 días, a 10x podemos observar solo el tejido de la rata ya que el biomaterial se reabsorbido, negativo para VK.

Figura B. Fotomicrografía de PLA 60 días, a 10x, podemos observar el andamio integrado con el tejido conectivo, sin embargo se muestra negativo a la tinción de VK.

Figura C. Fotomicrografía de PLA+MSCat 60 días, a 10x, se observa el constructo integrado con el tejido conectivo, sin embargo se muestra negativo a la tinción de VK.

Figura D. Fotomicrografía de PLA+MSCost 60 días, a 10x, se puede apreciar el constructo integrado con el tejido conectivo, sin embargo se muestra negativo a la tinción de VK.

Control Positivo para VK (Mandíbula de Rata)

Se observan depósitos de calcio en nuestro control positivo para la prueba de VK.

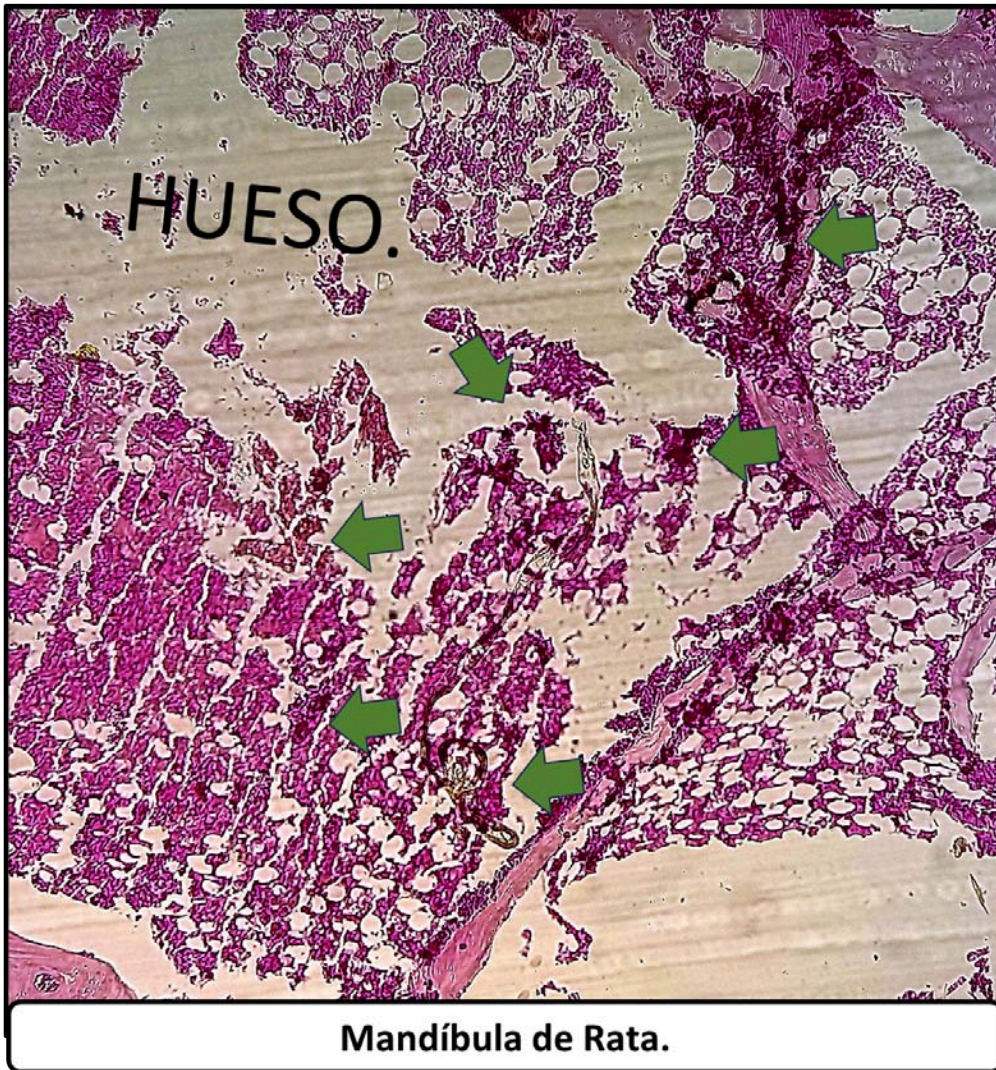


Figura 32 Control Positivo de VK (Mandíbula de Rata). En la imagen podemos observar depósitos de calcio en hueso sano de mandíbula de rata, dando como resultado a positivo en la prueba de VK.

Inmunohistoquímica.

Para determinar nuestro tercer objetivo específico: **“Determinar si hay presencia de marcaje positivo para OC”**, realizamos el análisis de inmunohistoquímica, en donde buscamos evidenciar la presencia del marcaje de OC.

Osteocalcina.

La osteocalcina es una proteína de unión al calcio dependiente de la vitamina K, sintetizada por los osteoblastos y osteocitos maduros, además es la proteína no colágena más abundante de la matriz extracelular (MEC) y es la décima proteína más abundante en los vertebrados.

Se considera un marcador sensible y específico de la actividad osteoblástica. Posteriormente a su síntesis la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso pero en pequeñas cantidades se liberan a la circulación considerándose un marcador de formación ósea.(Rubert et al., 2020, Hauschka et al., 1989 y Villarreal Brito et al., 2013)

En los resultados de esta tesis, se mostró poco marcaje en los constructos y el andamio, comparándolos con nuestro control positivo (Mandíbula de Rata), además de un marcaje nulo en GELFOAM.

GELFOAM 21 días

En esta imagen podemos observar que el grupo de GELFOAM 21 días fue negativo para OC.

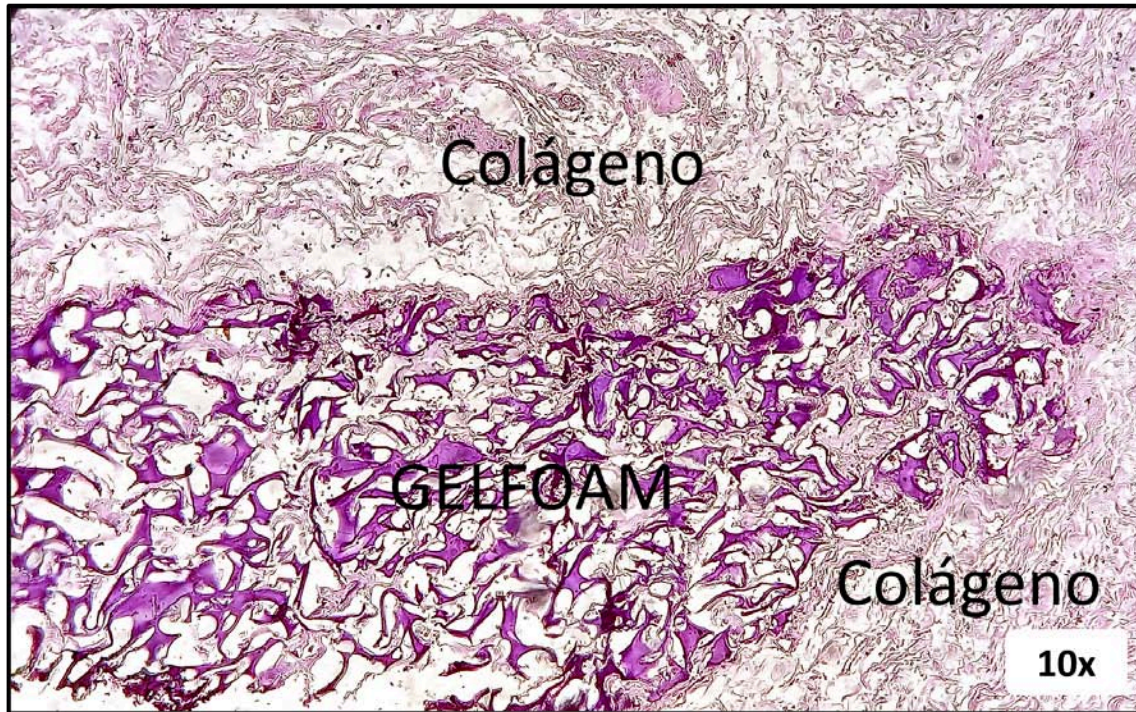


Figura 33 GELFOAM implantado en piel de rata a 21 días , a 10x, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

En la fotomicrografía podemos observar que el biomaterial se encuentra sin alteraciones, encapsulado por redes de colágeno y negativo a marcaje de OC.

GELFOAM 60 días.

En esta imagen podemos observar que el grupo de GELFOAM 60 días, se reabsorbió el biomaterial y fue negativo para OC.

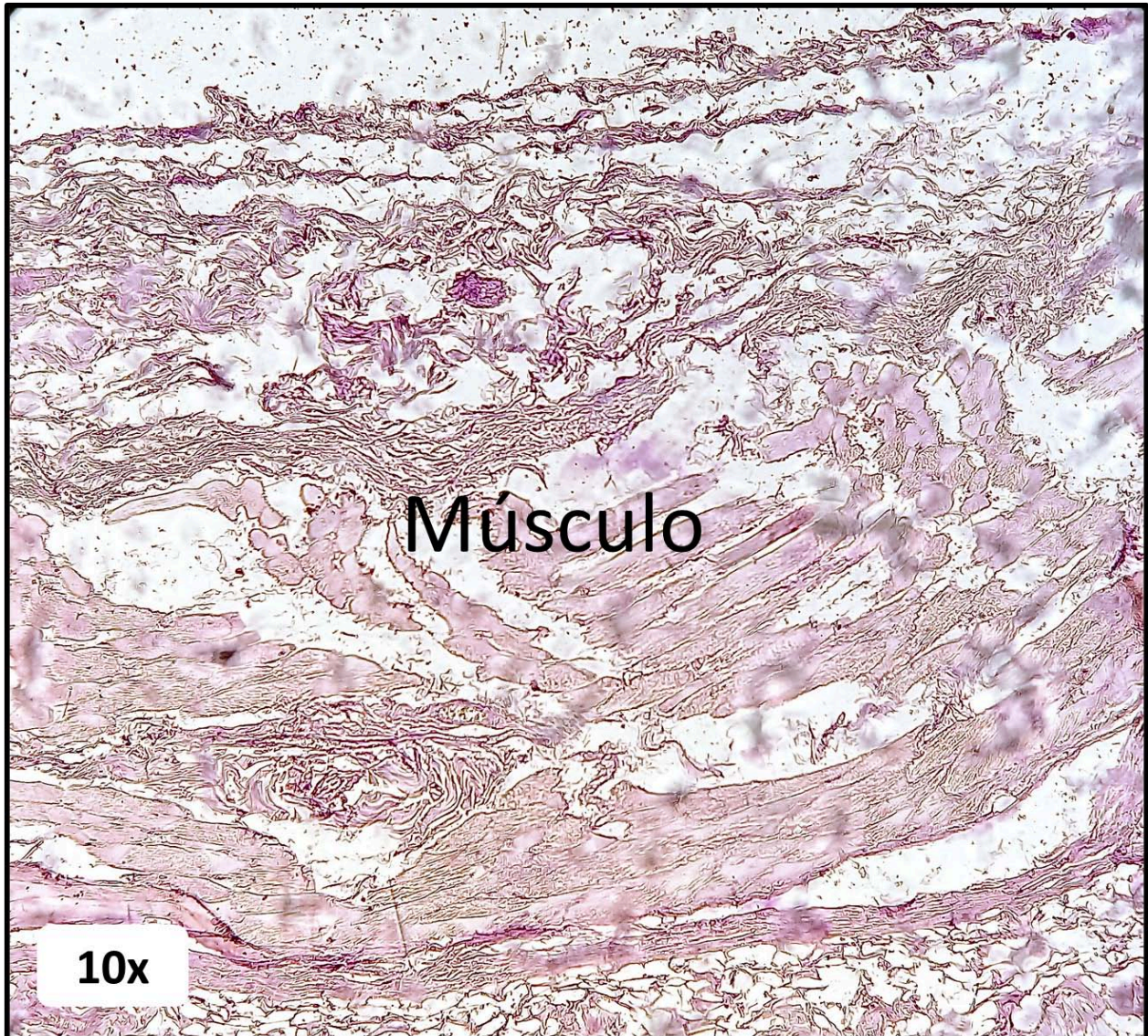


Figura 34 GELFOAM implantado en piel de rata a 60 días , a 10x, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

En la fotomicrografía podemos observar que el biomaterial se reabsorbe en la piel de la rata y negativo a marcaje de OC.

PLA 21 días.

En esta imagen podemos observar que el grupo de PLA 60 días está integrado con el tejido conectivo y fue negativo para OC.

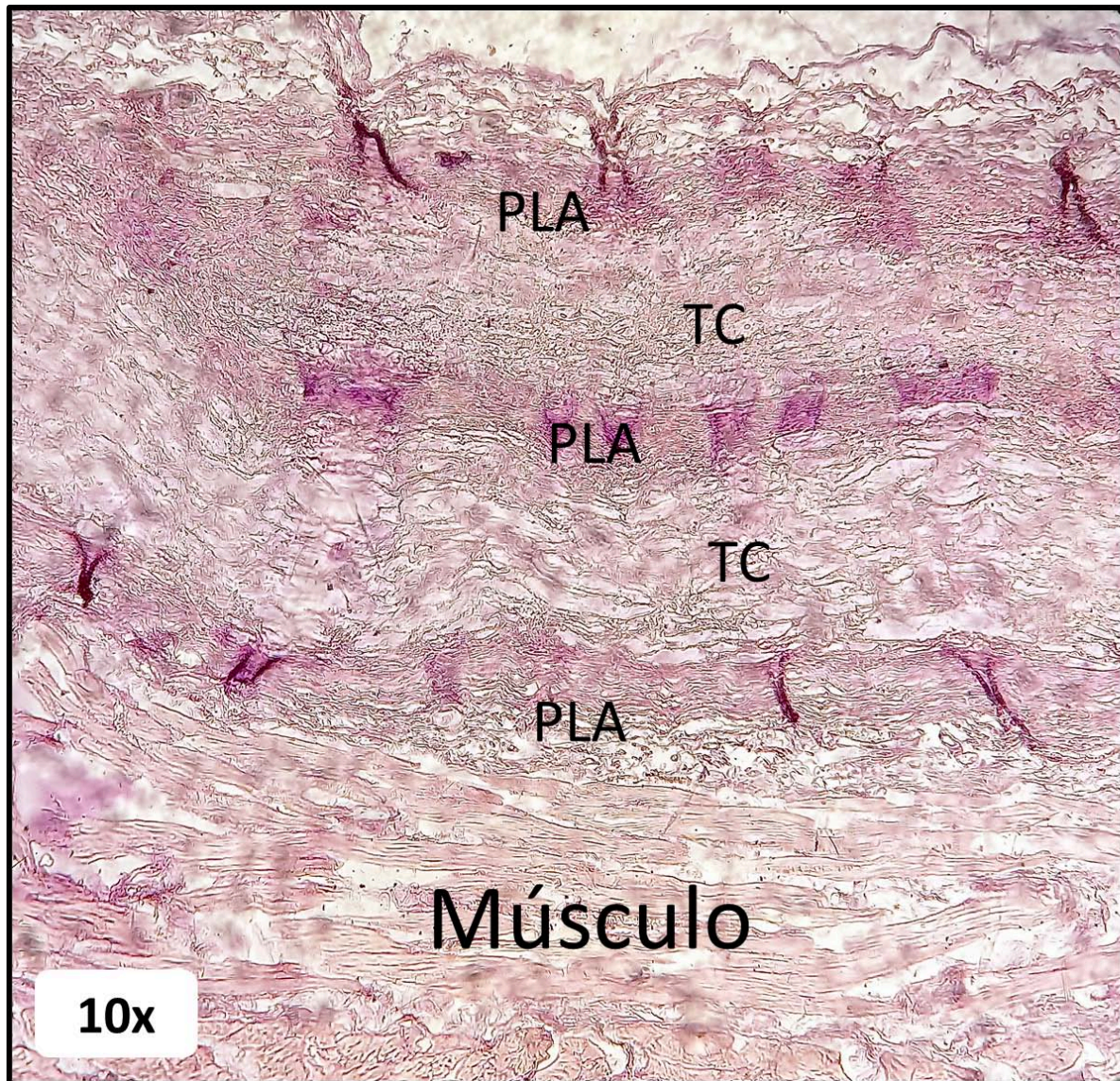


Figura 35 PLA implantado en piel de rata a 21 días, a 10x técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

En la fotomicrografía podemos observar que el andamio se encuentra sin alteraciones, entre las capas de este se encuentra integrado el TC y negativo a marcaje de OC.

PLA 60 días.

En esta imagen podemos observar que el grupo de PLA 60 días están integradas las 3 capas del andamio con el tejido conectivo y fue positivo para OC.

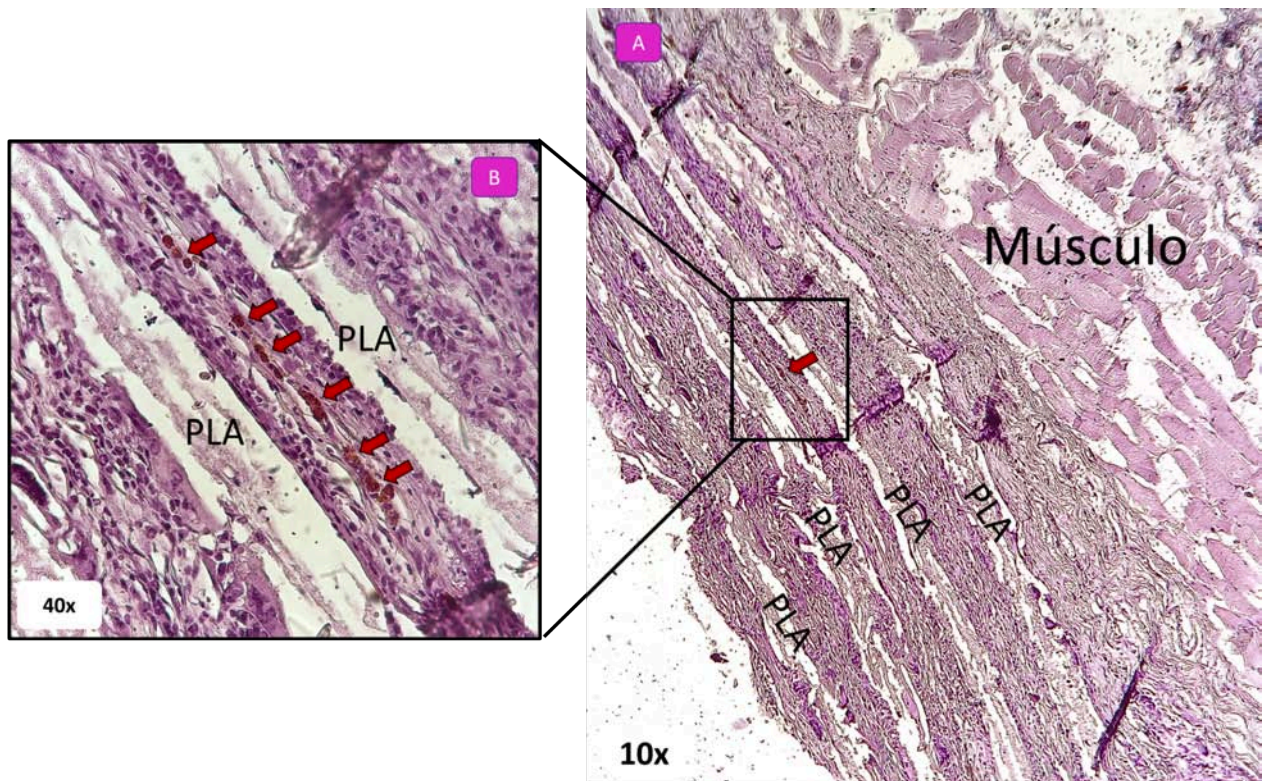


Figura 36 PLA implantado en piel de rata a 60 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura A. En la fotomicrografía a 10x, podemos observar que el andamio se encuentra sin alteraciones, entre las capas de este se encuentra integrado el TC y con marcaje positivo de OC

Figura B. En la fotomicrografía a 40x, podemos observar que entre las capas del andamio se encuentra marcaje positivo para OC.

PLA+MSCat 21 días.

En esta imagen podemos observar que el constructo está integrado con el tejido conectivo y fue positivo para OC.

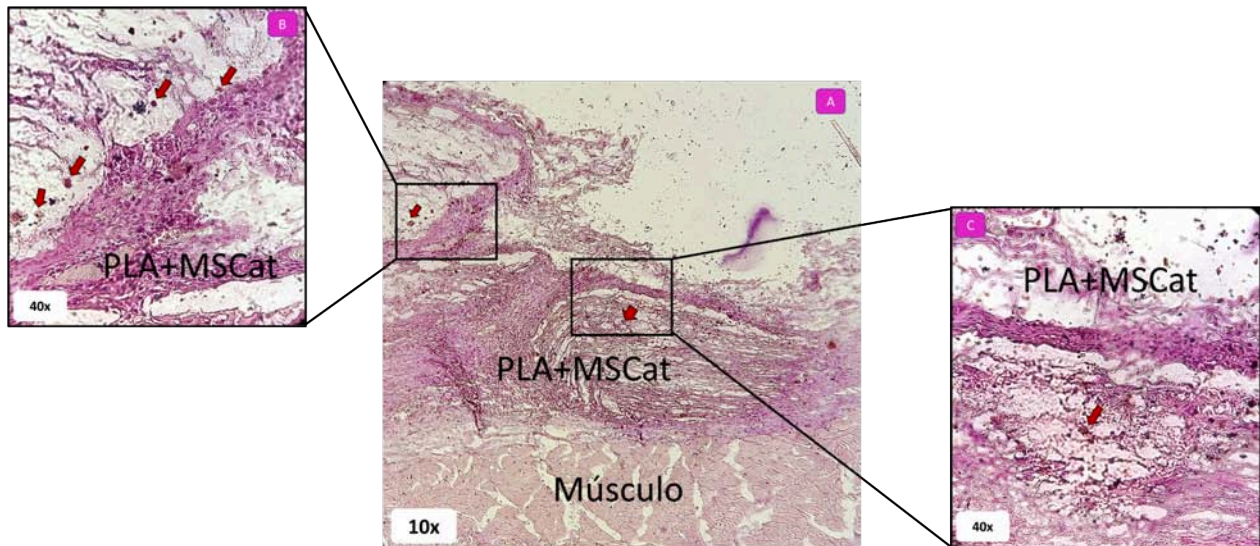


Figura 37 PLA+MSCat implantado en piel de rata a 21 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura A. En la fotomicrografía a 10x, podemos observar que el constructo se encuentra integrado el TC sin alteraciones y ligero marcaje positivo de OC.

Figura B. En la fotomicrografía a 40x, podemos observar una parte del constructo donde se aprecia ligero marcaje positivo de OC.

Figura C. En la fotomicrografía a 40x, podemos observar otra parte del constructo donde se aprecia ligero marcaje positivo de OC.

PLA+MSCat 60 días.

En esta imagen podemos observar que el constructo está integrado con el tejido conectivo y fue positivo para OC.

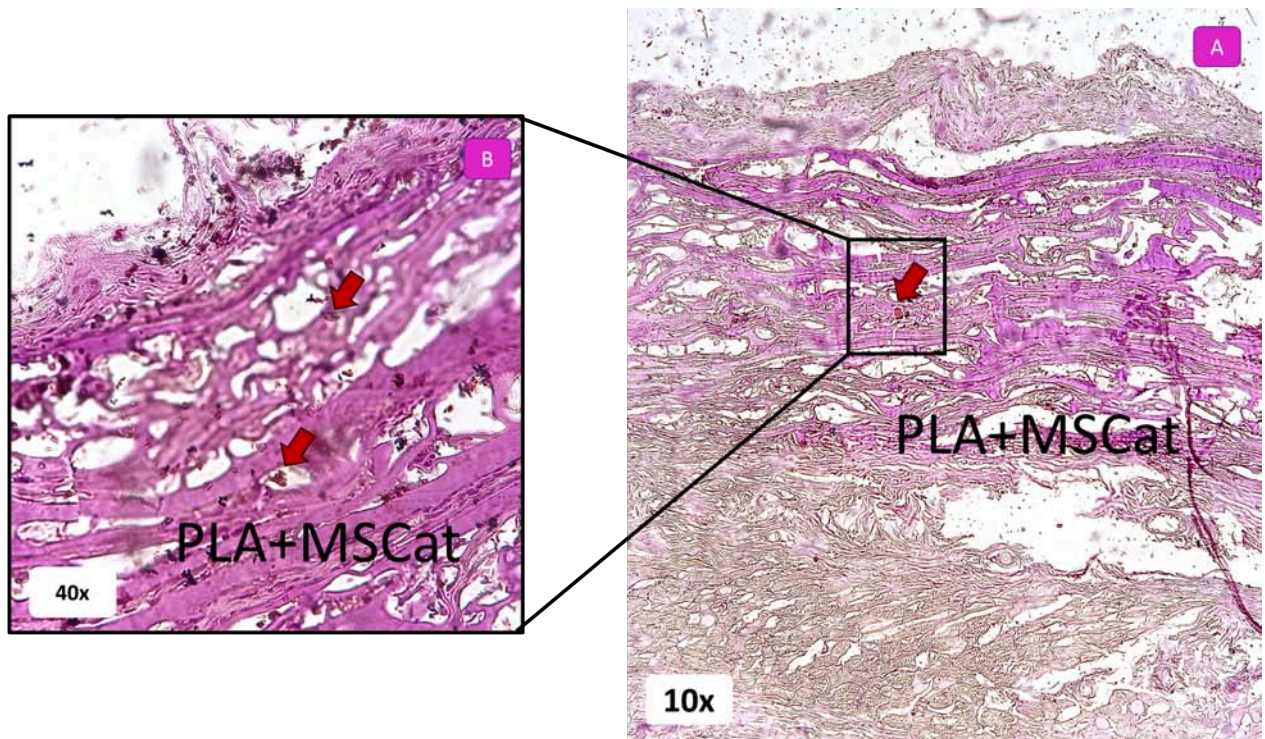


Figura 38 PLA+MSCat implantado en piel de rata a 60 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura A. En la fotomicrografía a 10x, podemos observar que el constructo se encuentra integrado el TC sin alteraciones y ligero marcaje positivo de OC.

Figura B. En la fotomicrografía a 40x, podemos observar una parte del constructo donde se aprecia ligero marcaje positivo de OC.

PLA+MSCost 21 días.

En esta imagen podemos observar que el constructo está integrado con el tejido conectivo y fue positivo para OC.

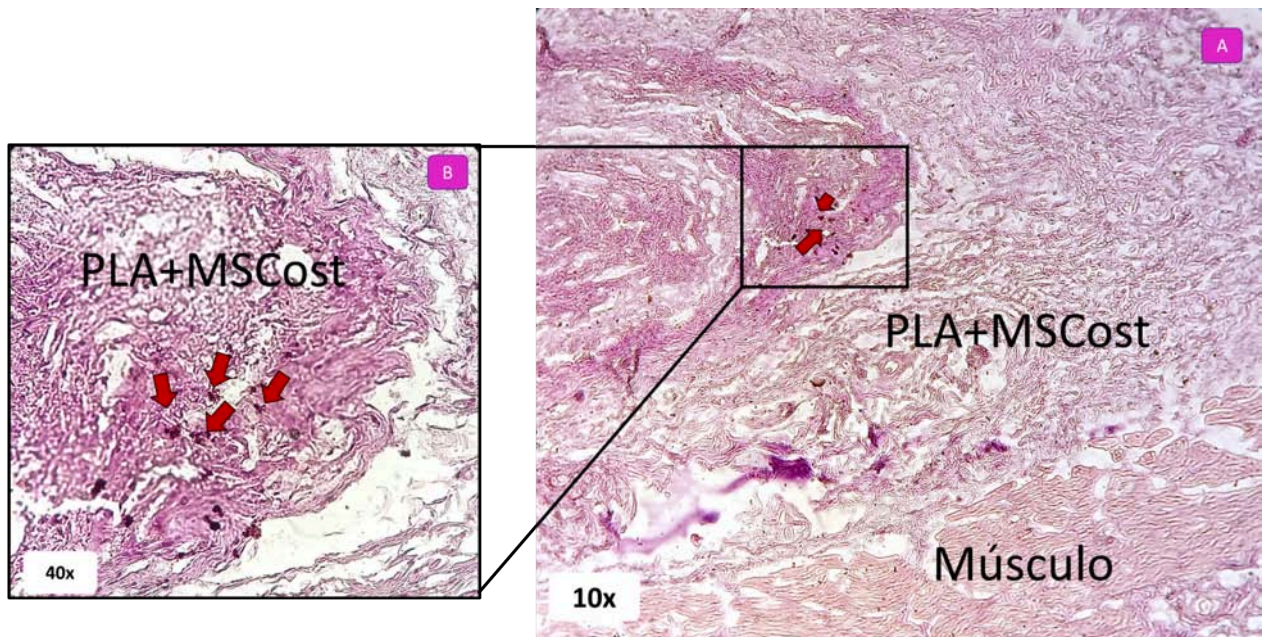


Figura 39 PLA+MSCost implantado en piel de rata a 21 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura A. En la fotomicrografía a 10x, podemos observar que el constructo se encuentra integrado el TC sin alteraciones y ligero marcaje positivo de OC.

Figura B. En la fotomicrografía a 40x, podemos observar una parte del constructo donde se aprecia ligero marcaje positivo de OC.

PLA+MSCost 60 días.

En esta imagen podemos observar que el constructo está integrado con el tejido conectivo y fue positivo para OC.

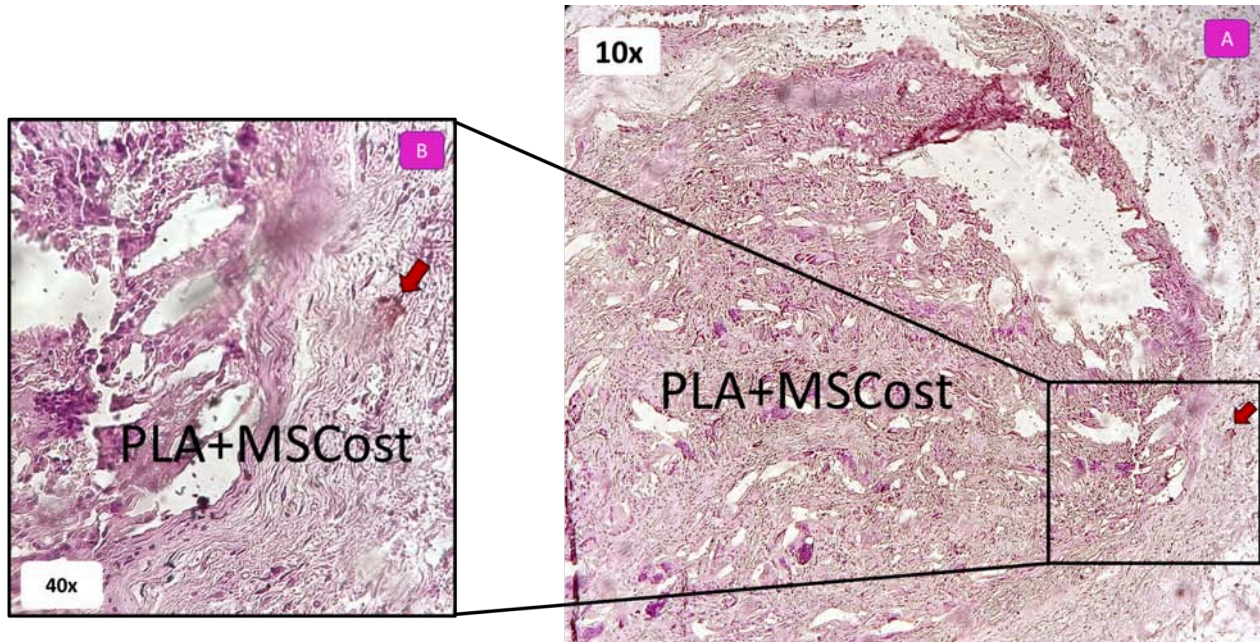


Figura 40 PLA+MSCost implantado en piel de rata a 60 días, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura A. En la fotomicrografía a 10x, podemos observar que el constructo se encuentra integrado el TC sin alteraciones y ligero marcaje positivo de OC.

Figura B. En la fotomicrografía a 40x, podemos observar una parte del constructo donde se aprecia ligero marcaje positivo de OC.

Mandíbula de rata (Control positivo para OC).

Se observa el diente de una mandíbula de rata, en donde el marcaje positivo de osteocalcina está presente en mayor medida que en otros grupos, ya que este es nuestro control positivo.

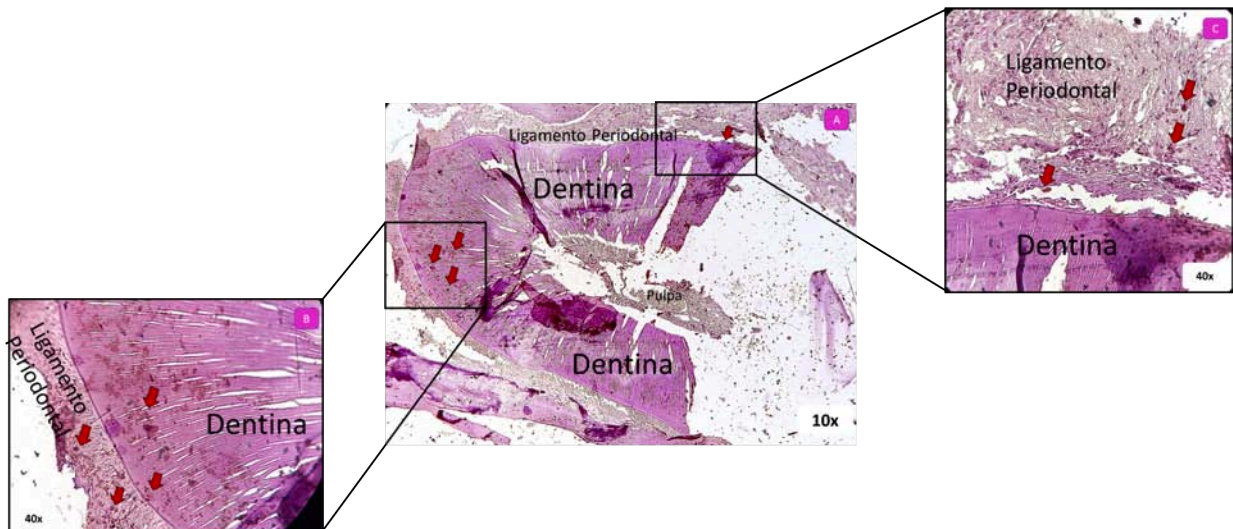


Figura 41 Mandíbula de rata, técnica de inmunohistoquímica con marcador de Osteocalcina (OC).

Figura A. En la fotomicrografía a 10x, podemos observar que existe marcaje positivo de OC, en especial en la zona de la dentina y ligamento periodontal del diente de la rata.

Figura B. En la fotomicrografía a 40x, se aprecia marcaje positivo de OC, en el área de dentina y ligamento periodontal.

Figura C. En la fotomicrografía a 40x, se observa marcaje positivo de OC, en dentina y ligamento periodontal.

Microscopía electrónica de Barrido MEB.

Con la finalidad de describir y ejemplificar la interacción del material, andamio y constructos en el tejido, además de caracterizar el PLA. Se realizó un análisis en MEB.

GELFOAM.

Se observa las fibras del biomaterial de manera desorganizada interactuando con el tejido, en una vista longitudinal.

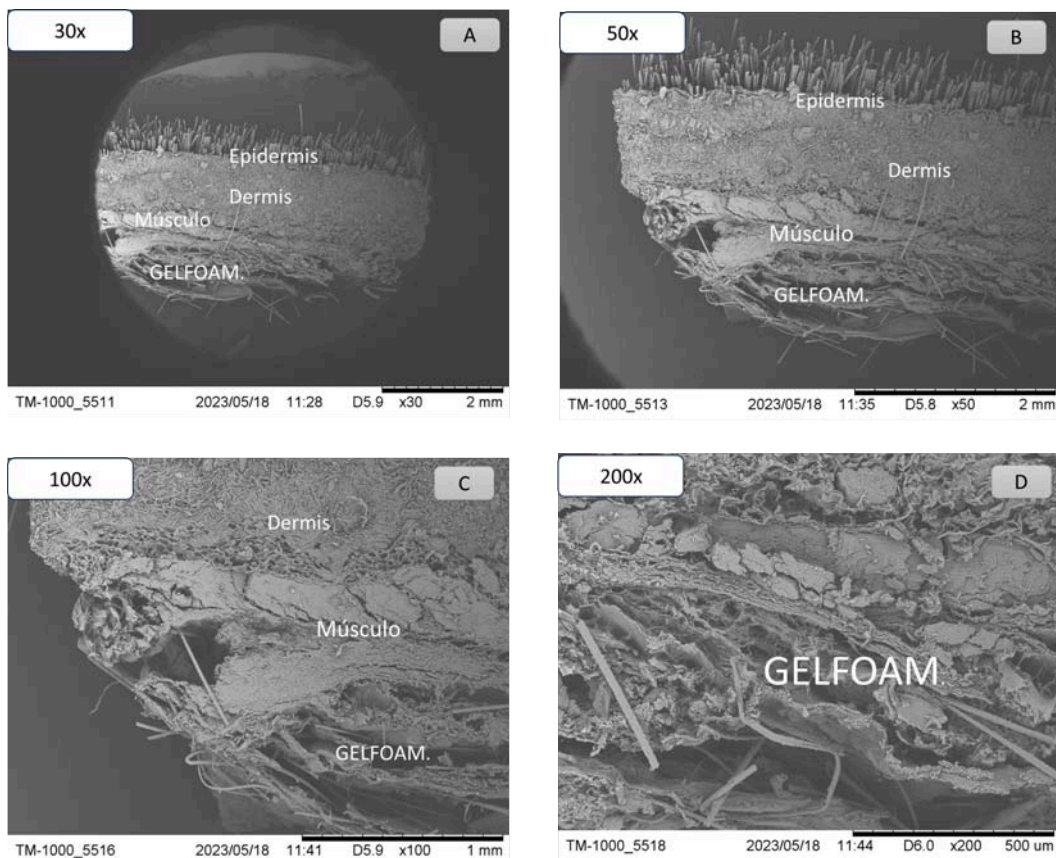


Figura 42 Fotomicrografía longitudinal del GELFOAM implantado en piel de rata *in vivo*, fotomicrografía tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 50x, 100x y 200x).

Figura A. En la fotomicrografía a 30x, podemos observar. La epidermis y la dermis sin alteraciones aparentes al igual que el músculo y que el biomaterial de GELFOAM se encuentra de manera desorganizada a comparación del PLA.

Figura B. En la fotomicrografía a 50x, se observa la disposición desorganizada del biomaterial con la piel de rata.

Figura C. En la fotomicrografía a 100x, se aprecia con más claridad como se va integrando el TC con el andamio.

Figura D. En la fotomicrografía a 200x, podemos observar la disposición de las fibras del GELFOAM.

PLA.

Se observan las capas de PLA integrándose con el tejido conectivo, en una vista longitudinal.

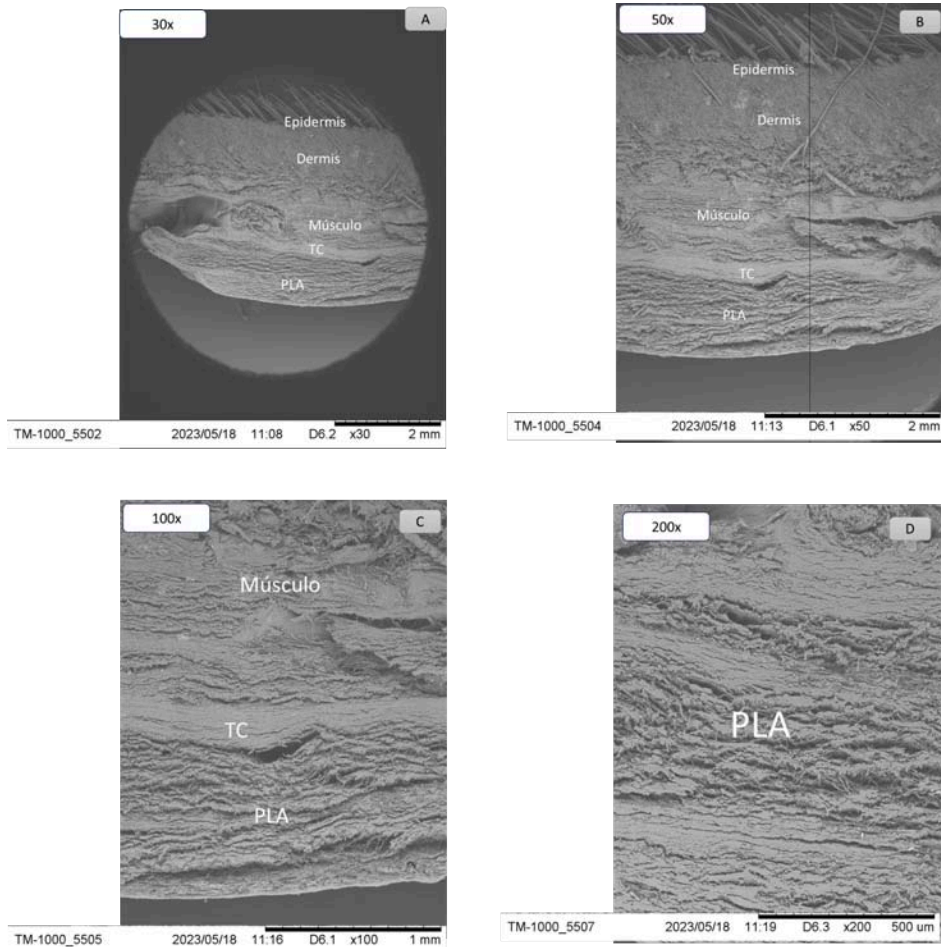


Figura 43 Fotomicrografía longitudinal del PLA implantado en piel de rata *in vivo*, fotomicrografía tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 50x, 100x y 200x).

Figura A. En la fotomicrografía a 30x, podemos observar. La epidermis y la dermis sin alteraciones aparentes al igual que el músculo y que el andamio de PLA se encuentra integrado el TC.

Figura B. En la fotomicrografía a 50x, se observa la disposición de las fibras del andamio, sin alteraciones aparentes y su integración al TC.

Figura C. En la fotomicrografía a 100x, se aprecia con mas claridad como se va integrando el TC con el andamio.

Figura D. En la fotomicrografía a 200x, podemos observar la disposición de las fibras del andamio.

PLA+MSCat.

Se observan las capas del constructo integrándose con el tejido y el músculo, en una vista longitudinal.

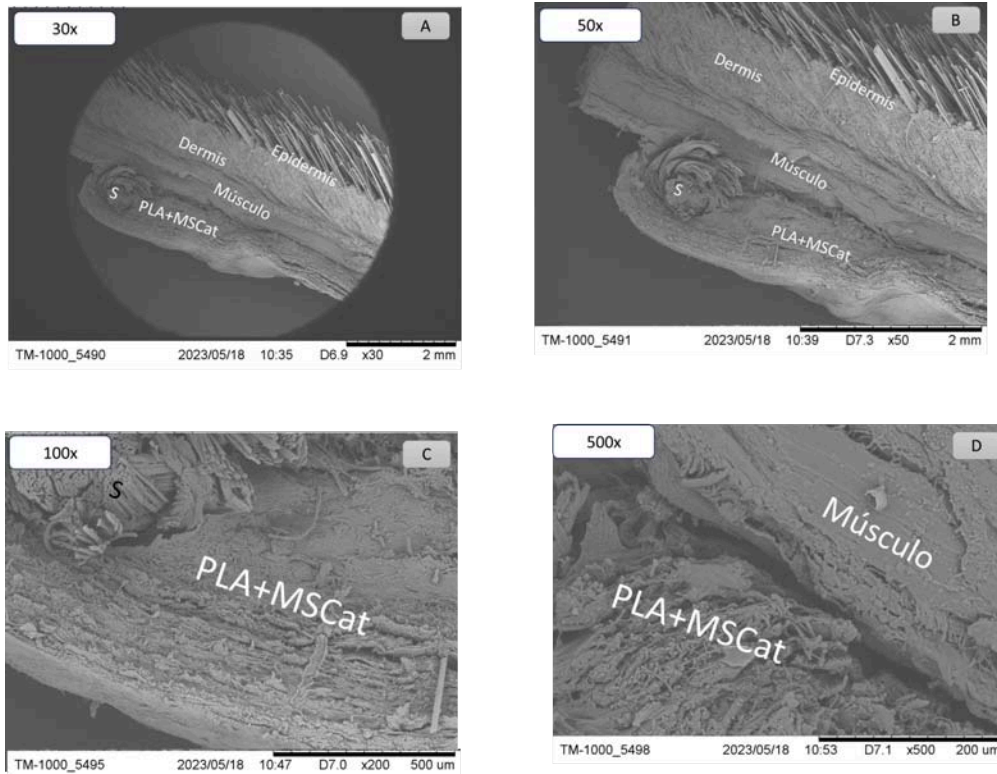


Figura 44 Fotomicrografía longitudinal del PLA+MSCat implantado en piel de rata *in vivo*, fotomicrografía tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 50x, 100x y 200x).

Figura A. En la fotomicrografía a 30x, podemos observar. La epidermis y la dermis sin alteraciones aparentes al igual, además que el músculo que el constructo se encuentra integrado el TC y se puede apreciar una parte de la S (Sutura)

Figura B. En la fotomicrografía a 50x, se observa la disposición de las fibras del constructo, sin alteraciones aparentes y su integración al TC.

Figura C. En la fotomicrografía a 100x, se aprecia con más claridad como se va integrando el TC con el constructo y una parte de la S.

Figura D. En la fotomicrografía a 200x, podemos observar la disposición de las fibras del constructo y su integración con el músculo, sin aparentes alteraciones.

PLA+MSCost.

Se aprecia con más detalle las porosidades del constructo y el cómo interactúan con el tejido, en una vista longitudinal.

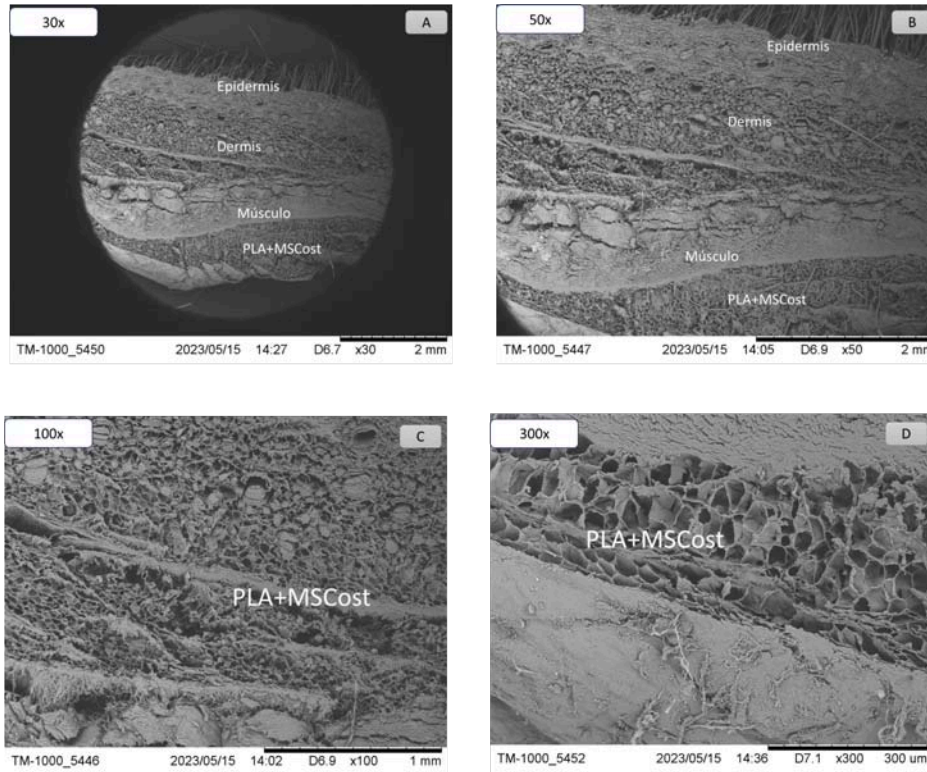


Figura 45 Fotomicrografía longitudinal del PLA+MSCost implantado en piel de rata *in vivo*, fotomicrografía tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 50x, 100x y 200x).

Figura A. En la fotomicrografía a 30x, podemos observar. La epidermis y la dermis sin alteraciones aparentes al igual que el músculo y que el constructo se encuentra integrado el TC.

Figura B. En la fotomicrografía a 50x, se observa la disposición de las fibras del constructo, sin alteraciones aparentes y su integración al TC.

Figura C. En la fotomicrografía a 100x, se aprecia con mas claridad como se va integrando el TC con el constructo y las fibras del mismo.

Figura D. En la fotomicrografía a 200x, podemos observar la disposición de las fibras del constructo.

Caracterización.

Se observa el hilado del PLA y la distribución de sus poros que es de 599 nm.

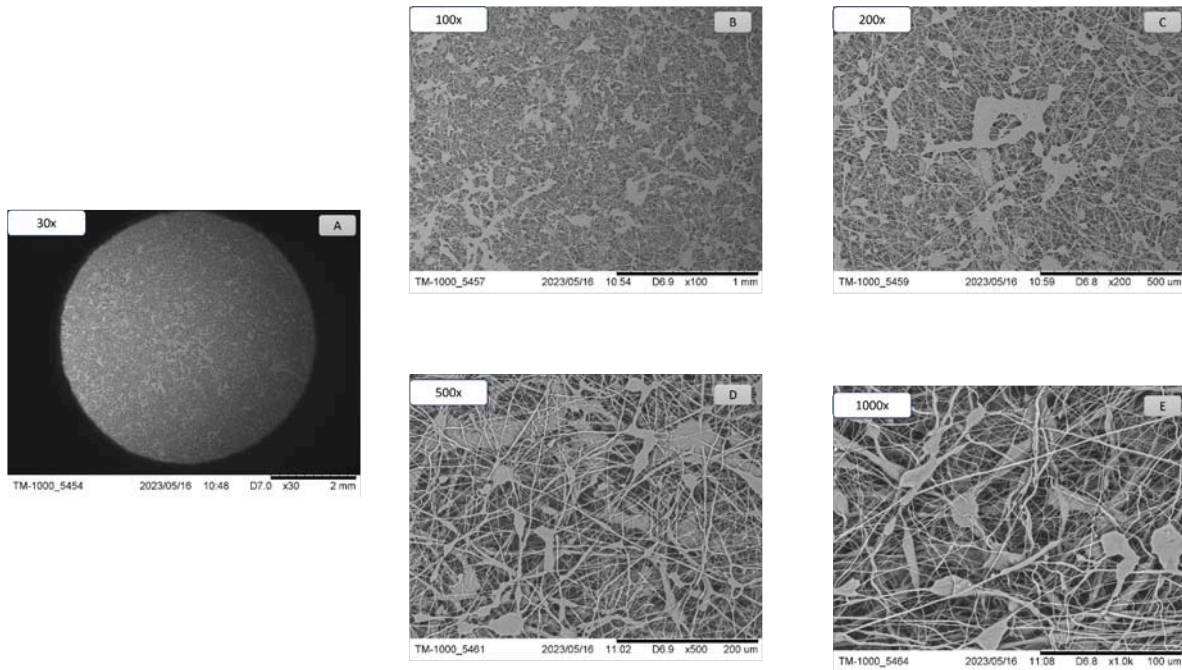


Figura 46 Fotomicrografía PLA, tomada en MEB a diferentes aumentos (30x, 100x, 200x, 500x y 1000x).

De manera general en todas las Fotomicrografías (A, B, C, D, E) observa el hilado del PLA y su distribución de los poros de un grosor promedio de 599 nm.

Discusión

La ITO, busca devolver la estructura y funcionalidad original al tejido óseo, teniendo como base los principios básicos de osteogénesis, osteoconducción, osteoinducción y osteointegración (Kasper et al., 2019); por ello, en esta tesis se creó un constructo 3D de PLA con células troncales mesenquimales de tejido adiposo inducidas al linaje osteogénico.

La arquitectura interna del andamio de PLA resultó adecuada para crecimiento celular; se sabe que el tamaño de poro adecuado para ITO debe ser de un rango de 100 -135 μm (Murphy & O'Brien, 2010), sin embargo, en nuestro andamio, tras las observaciones en MEB observamos una porosidad de 599 nm en promedio que fue suficiente para mantener la adherencia celular tanto *in vivo* como *in vitro* y pensamos que esto es porque se ha informado que los poros mayores de $\sim 300 \mu\text{m}$ son esenciales para la vascularización de las estructuras y del crecimiento óseo (Roosa et al., 2010 y Tsuruga et al., 1997).

Estrada y cols (Estrada, 2006) retoma la idea que las células ideales para la ITO deben ser fáciles de obtener y de expandir, ser multipotenciales para diferenciarse o transdiferenciarse a una variedad de células especializadas y no generar respuestas inmunes (Liao et al., 2008). Las células mesenquimales que obtuvimos del tejido adiposo fueron fáciles de obtener y el protocolo para su aislamiento es altamente reproducible, y son multipotenciales para diferenciarse a una variedad de células especializadas (Pojda, 2015 y Zuk P.A. 2001,) en el caso de esta tesis hacia el linaje osteogénico, que observamos en los grupos con el constructo PLA+MSCost.

El biomaterial utilizado para el andamio fue PLA al 10% hecho mediante técnica de electrohilado, que como ya se demostró, (Granados-Hernandez V, 2018 y Arreola Esquivel et al., 2022) es biocompatible, lo que corroboramos en nuestro estudio, ya que el PLA demostró poseer una adecuada adhesión y proliferación celular; y cuando lo implantamos *in vivo* observamos resultados favorables desde el día 1, ya que los especímenes mostraron inflamación leve o no mostraron inflamación ninguna.

Los constructos con PLA que se emplearon en la presente tesis demostraron tener adecuadas permeabilidad, rugosidad, biocompatibilidad, y una arquitectura interna agradable para las células, lo que observamos en nuestros estudios de MEB, en los que las células permanecieron y sobrevivieron, además, la biodegradabilidad fue adecuada ya que hasta el día 60 se mantuvieron las 3 capas de PLA, con abundantes células entre ellas, y en el caso de los constructos estos mantuvieron su arquitectura, además, a los 21 y 60 días no hubo inflamación, demostrando que fueron bien tolerados por el huésped (Wubneh, 2018).

En la presente tesis, realizamos la técnica de von kossa, que se utiliza para detectar la presencia de depósitos de calcio los tejidos, existen algunos estudios como el de Sordi y cols (Sordi et al., 2021) quienes utilizaron células que recolectaron de pulpa de dientes temporales, que cultivaron con diferentes medios osteogénicos, reportaron que observaron Von Kossa con altas densidades celulares y mineralización de la matriz extracelular a partir de los 21 días *in vitro*; lo que contrasta con nuestros resultados que fueron negativos a Von kossa, probablemente porque nuestros estudios fueron realizados *in vivo*, y nosotros realizamos esta prueba de von Kossa en los constructos después de que fueron implantados dentro del huésped vivo en el tejido conectivo, que carece de bioseñales que mantengan esta respuesta

osteogénica. Aún así quisimos corroborar estos resultados con la prueba de inmunohistoquímica para detectar el marcador OC que es una proteína sintetizada por osteoblastos y osteocitos maduros, por ello son utilizados como marcadores específicos de la actividad osteoblástica (Brennan-Speranza & Conigrave, 2015; Ducky et al., 1996; Rubert et al., 2020) y esta resultó negativa en todos los grupos, hecho que contrasta con el estudio de Gudúric y cols (Guduric et al., 2017) en el que ellos sí encontraron marcaje en un cocultivo sin embargo, sus andamios de PLA fueron elaborados con la técnica de impresión 3D y el de esta tesis está elaborado mediante la técnica de electrohilado, además de que utilizaron células obtenidas de médula ósea y no en tejido adiposo. Su marcaje fue positivo en cultivo y no *in vivo* como se presentó en esta tesis.

Conclusiones.

Con el apoyo de técnicas histológicas de H-E y MEB pudimos determinar que el andamio de PLA es biocompatible y se integró de manera correcta al tejido de la rata, en los constructos elaborados con el andamio y células diferenciadas a tejido osteogénico PLA+MSCost se vio reflejado en nuestros resultados de la inmunohistoquímica marcaje negativo para OC y en nuestros resultados de la técnica de Von Kosaa que fueron negativos, no se pudo determinar fue la propiedad de osteoinducción y osteoconducción ya que no se pudo observar que se halla formado hueso nuevo *in situ* durante el tiempo que estuvieron implantados en el tejido subcutáneo nuestros constructos.

Anexo Metodología

Anexo 1. Manejo de los especímenes.

Las ratas fueron tratadas y cuidadas de acuerdo con la “NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999”; tuvieron agua y comida *Ad-libitum* durante todos los procedimientos, con ciclos 12:12 de luz/obscuridad.

Para todos los procedimientos quirúrgicos, los animales fueron anestesiados con Sedalphorte® (Pentobarbital 40 mg/kg) y un relajante muscular de PROCIN® (Xilazina 7 mg/kg); y después de todos los procedimientos, se médico con antibiótico (Bencilpenicilina sódica cristalina/Enrofloxacina 5 mg/2 mg/kg) en una sola dosis y analgésico TRAMADOL JET ®(Tramadol 5 mg/kg) cada 24 horas durante los tres días siguientes a las cirugías.

La eutanasia se realizó por sobre exposición de CO² y los cadáveres, así como, todos los residuos biológico/infecciosos se manejan de acuerdo con la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Anexo 2. Obtención de las MSCat.

Biopsias de tejido adiposo subcutáneo.

1. Como se mencionó previamente los animales fueron pesados y anestesiados vía intraperitoneal.
2. La zona quirúrgica a trabajar, fue rasurada y la asepsia se realizó con ANTIBENZIL ®. (solución Cloruro de benzalconio 1.0).
3. Utilizando un mango de bisturí del numero 3 y bisturí número 15 se realizó una incisión cutánea en la zona abdominal, en el área ventral central del animal, en una sola intención de 2.5 cm de longitud aproximadamente, con el fin de exponer el tejido adiposo subcutáneo abdominal e inguinal.
4. Con la ayuda de pinzas tipo mosco curvo se realizó disección roma extrayendo la mayor cantidad de tejido adiposo, cuidando de no dañar estructuras aledañas.
5. Una vez obtenidas las muestras, se pesaron y en todos los casos se obtuvieron 3g en promedio.
6. Para su transporte y procesamiento, el tejido adiposo fue colocado en un tubo con solución HBSS 1x complementado con antibiótico/antimicótico al 2% (Biowest® EEUU).

7. Se suturó la herida con la técnica de puntos simples utilizando seda 3-0 y se limpió la herida con antiséptico (Antibenzil ®).
8. Se administró la medicación postquirúrgica.

Aislamiento y obtención de Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo (MSCat).

D/MEM suplementado (D/MEM con alto contenido de glucosa con glutamina estable y con piruvato de sodio Biowest® EEUU. Cat.Bio-I0103-500, adicionado con Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés; Gibco, EEUU a una concentración del 10% (v/v), y antibiótico a una concentración del 2% (v/v) (Penicilina-estreptomicina-Neomicina (PSN) Antibiotic Mixture Gibco™, Thermo Fisher Scientific.EEUU).

En el LIOA, dentro del cuarto de cultivo de GICTIT, en una campana de seguridad biológica clase II, tipo 2 y con condiciones estériles se llevó a cabo la extracción de las MSCat.

1. A las biopsias se les realizaron 3 lavados de duración aproximada de 5 minutos por lavado con 4 ml de solución HBSS 1x suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico (Biowest® ,EEUU).
2. Posteriormente, se colocaron las biopsias en cajas Petri de cristal para realizar la disgregación mecánica con bisturí del número 11, se realizaron fragmentos de 1 a 2 mm de diámetro aproximadamente.
3. Para la digestión enzimática se agregaron 3 ml de Colagenasa tipo 1 al 0.01% (GIBCO®, EEUU) a 37°C durante 45 minutos, agitando manualmente cada 5 minutos.
4. La reacción enzimática se inactivo utilizando 6 ml de **D/MEM suplementado** (Biowest® ,EEUU).

En todos los cultivos se empleó **D/MEM suplementado** que consistió en: D/MEM con alto contenido de glucosa, con glutamina estable y con piruvato de sodio (marca: Biowest® EEUU. Cat.Bio-I0103-500), adicionado con Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés; a una concentración del 10%v/v (GIBCO®, EE UU), y antibiótico a una concentración del 2% (v/v) (Penicilina-estreptomicina-Neomicina (PSN) Antibiotic Mixture GIBCO™, Thermo Fisher Scientific.EEUU).

5. Con un filtro de poro 100µm se filtró la muestra y la solución que se obtuvo se centrifugó a 1040 µm a temperatura ambiente durante 10 min.
6. Una vez centrifugada la solución anterior, se eliminó el sobrante lipídico; el PELLET se resuspendió en medio de cultivo D/MEM suplementado, se volvió a centrifugar, y dicho procedimiento se realizó 3 veces más, con la finalidad de obtener el botón celular lo más limpio posible.
7. Se eliminó el sobrante lipídico; y al PELLET o botón celular se le adicionaron 3 ml de medio de cultivo D/MEM suplementado y se incubó en condiciones estándares de cultivo: a 37°C con 5% de CO² y humedad relativa. Desde las primeras 48 horas en cultivo se observó la presencia de las primeras células adheridas, y cuando se logró la confluencia (80% de superficie del frasco ocupada por las células) se realizaron los subcultivos.

Subcultivos de MSCat.

Cuando los cultivos llegaron a confluencia, se realizaron 2 lavados con HBSS 1x, posteriormente, se agregó 1 ml de Tripsina (Tripsina/EDTA 0.1%, Biowest®,EEUU) y se incubó a 37°C con 5% CO² durante 3 min, con ayuda del microscopio invertido se comprobó que las células estuvieran suspendidas y para inactivar la acción de la tripsina se agregaron 2 ml de **D/MEM suplementado** con FBS 10%. Luego, se centrifugó la suspensión a 1040 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó con 1 ml de Biowest® (D/MEM) y se resuspendió para realizar su cuantificación, y posteriormente sembrado.

Cuantificación celular.

Con la fórmula de dilución: $V1 \times C1 = V2 \times C2$, donde **C1** es la concentración de la solución que hará un soluto **V1** el volumen inicial **V2** el volumen a preparar y **C2** la concentración de la solución final. Se realizó el contaje celular mediante el siguiente procedimiento: una vez obtenido el botón celular, fue resuspendido en 1 ml de medio de cultivo, se tomaron 50 µl de esta dilución y fueron colocados en un tubo eppendorf de 1 ml adicionando 50 µl de azul Tripano, se homogeneizó la mezcla y se tomaron 10 µl de dicha solución para introducirlo en la cámara de Neubauer y realizar el conteo con ayuda de un microscopio óptico.

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

Donde **V1**: Volumen inicial

C1: Concentración de la solución que hará un soluto.

V2: volumen a preparar

C2: Concentración de la solución final.

Anexo 3. Obtención de las MSCost.

Diferenciación celular al Linaje Osteogénico.

Para inducir la diferenciación celular al linaje osteogénico, se realizaron subcultivos de MSCat, en el 3er subcultivo. Se lavó 2 veces con HBSS 1x (Biowest®, EEUU) y posteriormente, se cultivo con medio de cultivo osteogénico, que se preparó de la siguiente manera: el D/MEM suplementado con FBS 10% (Biowest® EEUU) se adiciono con Dexametasona 0.1mM beta-glicerol-fosfato 10 mM y ascorbato 2 fosfato 10 mM y se cultivó en condiciones estándares (Zuk et al., 2001). El medio de cultivo se cambió cada tercer día, a los 14 días, en el microscopio invertido se observaron cambios morfológicos celulares, que evidenció la diferenciación celular al linaje osteogénico. (Yudho y cols, 2007)

Anexo 4. Andamio de PLA.

Los andamios han sido previamente probados y caracterizados (Granados-Hernández et al., 2018) demostrando que estos andamios de PLA son deseables para las células, y podrían proporcionar soporte mecánico para las interacciones celulares que mejoran las respuestas biológicas.

Anexo 5. Implante de los constructos.

Los especímenes fueron anestesiados como se indicó antes. Se rasuró a los especímenes en toda el área dorsal y se realizó antisepsia con cloruro de benzalconio (Antibenzil®). La zona quirúrgica fue cubierta con un campo estéril hendido. Se realizó una incisión en la dermis, siguiendo como referencia anatómica un punto medio a caudal 2.5 cm entre los omoplatos, con ayuda de unas pinzas mosco curvas se realizó disección roma y se implantaron los constructos, andamio y biomaterial como se observa en la Figura 12 .

Como control negativo se empleó GELFOAM (Gelatina de Piel Porcina Purificada) que es una esponja absorbible estéril y un agente hemostático que se usa con regularidad en odontología. Su uso como control negativo se debe a que dicho material no presenta cambios en el tejido una vez al ser implantado, solo se reabsorbe y funge como relleno.

Implantar todos los constructos en el mismo espécimen, y así en cada una de las ratas, nos permite asegurar que tuvieran el mismo microambiente biológico y que las características de cada individuo fueran las mismas.

Para finalizar con la cirugía, se suturó la herida con puntos simples y se administraron los medicamentos a los especímenes como ya se indicó.

Anexo 6. Seguimiento clínico de la inflamación.

Inflamación severa: Presencia de calor o aumento de la temperatura corporal. Rubor: se presenta mayor enrojecimiento en el área de la herida con los bordes de una gama del rojo al magenta. Evidencia del malestar general con el letargo de los especímenes.

Inflamación Moderada: Presencia de calor solo en el área de la herida. Rubor: Se presenta enrojecida la zona de la herida, con presencia de tumefacción que denotara un aumento de volumen del tejido y a la digito presión se presentaba sésil.

Inflamación Leve: tumefacción ligera, con ligero aumento de volumen y sin ser sésil.

Inflamación Nula: No presenta cambios de temperatura, ni enrojecimiento, sin aumento del volumen y mantiene sus funciones normales.

Anexo 7. Obtención y procesamiento de las muestras para su estudio histológico.

Finalizados los tiempos de estudio, se realizó la autanasia de los especímenes mediante sobreexposición de CO² en una cámara, este proceso se llevó a cabo en el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de de la FES Cuautitlan campo 4.

Se tomaron las muestras de piel dorsal de las zonas en donde se realizó el implante de aproximadamente 1 cm de diámetro cada una, y se fijaron con paraformaldehído 4% pH 7 durante al menos 6 horas. Los procedimientos realizados para el procesamiento de muestras fueron realizados de acuerdo al Manual de “Principios de Microtecnia” (Fariña, 2019) , realizado por el Dr. Germán Isauro Garrido Fariña (Fariña, 2003)

Posteriormente, las muestras se deshidrataron siguiendo el protocolo de inclusión de rutina: Tabla 2.

Reactivo.	Tiempos de Radiación en horno de microondas.	Tiempo de reposo.	Tiempo Total
Alcohol 70%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 70%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 80%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 80%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 92%	2 minutos	13 minutos	15 minutos

Alcohol 92%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 98%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 98%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 100%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 100%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Xileno-cloroformo		24 horas	
Parafina I		2 horas	
Parafina II		2 horas *Punto de fusión de 48°C. Figura 47.	

Tabla 2 Proceso de deshidratación de muestras para su inclusión.



Figura 47 Fotografías del proceso de inclusión en parafina.

A. Imagen del proceso de inclusión de parafina. **B.** Muestras de 21 días incluidas en parafina.

Se realizaron cortes seriados de las muestras incluidas de 5 micras de espesor y puestos para su expansión de un baño de agua, los cuales fueron montados con portaobjetos. Se utilizó un microtomo de rotación I (Leica RM2125RT)

Para una correcta adherencia de las muestras es necesario preparar los portaobjetos previamente con poli-lisina durante 5 minutos y fueron llevados a un horno de secado durante 1 hora. Los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente y fueron marcados por el N° de muestra, N° de corte, N° de rata y grupo de muestra. Los portaobjetos con los cortes histológicos se conservaron de 12 a 24 horas en la estufa a 55- 60°C para lograr una mejor adherencia del corte.

Técnica de Hematoxilina y Eosina. (HyE)

Su principio se basa en una coloración bicromía porque usamos 2 colorantes, la hematoxilina como colorante básico, que nos ayudará a teñir estructuras ácidas y la eosina como colorante ácido para teñir estructuras básicas. Se realizó el procedimiento que se encuentra en la **Tabla 3**

- Núcleos: Morados- Azul
- Citoplasma: Rosa- Naranja.

Reactivo	Tiempo
Xileno I	15 minutos.
Xileno II	15 minutos
Alcohol 100°	5 min
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Agua	5 minutos
Hematoxilina de Garrido.	5 minutos
Alcohol ácido	5 segundos
Lavado en agua corriente	Hasta que se vea azul
Enjuague con agua destilada	10 minutos

Teñido con eosina	10 minutos.
Deshidratado con alcohol al 96°	Lavado rápido.
Alcohol absoluto I	5 minutos
Alcohol absoluto II	5 minutos
Aclarar con xileno I	5 minutos
Xileno II	5 minutos
Montaje con resina sintética y se cubrió con el cubreobjetos	

Tabla 3 Proceso de la técnica de H-E.

Técnica Tricrómica de Masson. (TM)

Se utiliza para teñir las fibras elásticas en verde, mientras que las células musculares se tiñen en tonos de rosa o violeta. La técnica también tiñe el núcleo celular en negro o azul oscuro, lo que permite una fácil identificación de las células.

- Nucleos: Negros/Azul
- Citoplasma, queratina, músculo estriado: Rojo/rosa/violeta
- Fibras elásticas: Verdes

Se siguió el protocolo de la **Tabla 4**.

Reactivo	Tiempo
Xileno I	15 minutos
Xileno II	15 minutos
Alcohol 100°	5 minutos
Alcohol 96°	5 minutos

Alcohol 70°	5 minutos
Agua	5 minutos
Solución Bouin	1 hora a 56 °C
Lavado con agua corriente	Hasta haber quitado el colorante sobrante.
Lavado con agua destilada	Hasta haber quitado el colorante sobrante.
Teñido con Hematoxilina de Weigert	10 minutos
Lavado con agua destilada.	
Solución Escarlata de Biebrich	5 minutos
Lavado con agua destilada.	
Solución de ácido fosfotúngstico, ácido fosfomolibdico.	15 minutos
Solución Azul de anilina al 1%	5 minutos
Lavado con agua destilada	
Verde Luz 1%	5 minutos
Lavado con agua destilada	
Solución de ácido acético al 1%	5 minutos
Alcohol al 96°	Lavado rápido.

Alcohol absoluto I	5 minutos
Alcohol absoluto II	5 minutos
Xileno I	5 minutos
Xileno II	5 minutos
Montaje con resina sintética y se cubrió con el cubreobjetos	

Tabla 4 Proceso de la técnica de TM.

Von Kossa.

La tinción de Von Kossa se utiliza para detectar la presencia de depósitos anormales de calcio en el organismo. El principio de coloración se basa en la transformación de sales de calcio en sales de plata: los iones de calcio, unidos a los fosfatos, son sustituidos por iones de plata aportados por una solución de nitrato de plata. Bajo una fuente de luz los fosfatos de plata sufren una degradación fotoquímica, lo que conduce a la observación de depósitos de plata metálica.

Principio de demostración de aniones de sales de calcio por medio de plata reducida.

Resultados: Depósitos de calcio

- Sales: Negro
- Núcleos: Rojos
- Citoplasma: Rosa

Se siguió el protocolo de la **Tabla 5**.

Reactivo	Tiempo
Xileno I	15 minutos
Xileno II	15 minutos

Alcohol 100°	5 minutos
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Agua	5 minutos
Solución Nitrato de Plata 5%	30 minutos
Enjuague con agua destilada	3 minutos
Meta bisulfito de sodio de Na 5%	3 minutos
Enjuague con agua destilada	3 minutos
Rojo nuclear sólido	5 minutos
Enjuague con agua destilada	5 minutos
Alcohol al 96°	Lavado rápido.
Alcohol absoluto I	5 minutos
Alcohol absoluto II	5 minutos
Xileno I	5 minutos
Xileno II	5 minutos
Se realizó el montaje con resina sintética y se cubrió con el cubreobjetos.	

Tabla 5 Proceso de la técnica de VK.

Técnica de Inmunohistoquímica.

La finalidad de esta técnica es la localización de moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos. En este caso utilizamos Osteocalcina OC, conocida también como proteína ósea del ácido γ -carboxiglutámico (Gla) o BGP, es una proteína secretada de 46 a 50 aminoácidos, es producida principalmente por los osteoblastos. (*Técnicas Histológicas. 5. Tinción. Inmunohistoquímica. Atlas de Histología Vegetal y Animal, s. f.*)

La osteocalcina es la proteína no colágena más abundante en el hueso y se expresa específicamente en los osteoblastos.

Se utilizaron los anticuerpos: **Tabla 6**. Se siguió el protocolo de la **Tabla 7**.

Anticuerpo	Especificidad	Información del Anticuerpo.
Osteocalcina	Osteoblastos maduros	Osteocalcina Rabbit Sc-30044. 1:100.

Tabla 6 Especificaciones del anticuerpo (OC) ocupado en la inmunohistoquímica.

Reactivo	Tiempo
Xileno I	30 minutos
Xileno II	15 minutos
Alcohol 100°	5 minutos
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Agua	5 minutos

Lavados con PBS (pH=7.4)	tres pases de 5 minutos cada uno.
Permeabilización de las muestras con Tritón X-100 al 0.01% durante 30 minutos.	
Bloqueo con BSA 3% Bloqueo de zonas de unión específicas con BSA (albúmina sérica bovina) al 4% en PBS (pH=7,4), durante 15 minutos a temperatura ambiente.	durante 15 minutos a temperatura ambiente.
Anticuerpo 1° Osteocalcina en dilución 1:100 con BSA 3%	Toda la noche a 4°C
Lavado con PBS	3 lavados de 5 minutos
Incubación Anticuerpo Secundario Ig G anti conejo-ratón 1:100 con BSA 3%	1 hora
Lavado con PBS	5 minutos
Incubación reacción enzimática AB	30 minutos
Lavado con PBS	3 lavados de 5 minutos
Sustrato de peroxidasa	Incubar 10 minutos
Lavar con agua bidestilada	5 minutos
Teñir con Hematoxilina de Crazy	17 minutos
Lavado con agua corriente	10 minutos

Alcohol 70%	5 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol 100%	5 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Montaje con bálsamo de Canadá y se cubrió con el cubreobjetos.	

Tabla 7 Proceso de la técnica de inmunohistoquímica para OC.

Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

La microscopía de barrido electrónico, es una técnica de obtención de imágenes ampliamente utilizada en investigación de materiales debido a su alta resolución y capacidades de analizar características morfológicas, estructurales y químicas de las muestras bajo estudio. (Clavijo Penagos, 2013). Se siguió el protocolo de la **Tabla 8**.

Reactivo	Tiempo
Fijación de las muestras con glutaraldehido 3%	2 horas a 4°C
Las muestras se tallaron con bisturí del no 22. (De tamaño pequeño para visualizarse mejor en el microtomo). Figura 48 .	
Lavado con agua bidestilada	15 minutos agitación en agitación mecánica Figura 48 .
Etanol 30°	15 minutos
Etanol 50°	15 minutos
Etanol 70°	20 minutos

Etanol 90°	20 minutos
Etanol 100°	20 minutos
Empaquetado las muestras en sobres de papel filtro.	
Se sumergieron las muestras en Etanol 100°	
Las muestras fueron llevadas al servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Alcalá, en donde fueron procesadas para llevarlas a punto crítico (deseccación total de las muestras sustituyendo el etanol 100° por CO ₂)	
Se montaron las preparaciones sobre platinas de aluminio de 11 mm de diámetro, utilizando cinta adhesiva doble cara. Figura 48.	
Las muestras fueron llevadas al servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Alcalá, en donde se realizó el metalizado (recubrimiento de la superficie de las muestras con una capa de oro u oro/paladio). Figura 48.	
Se visualizó al microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-IT500 InToucheScope).	

Tabla 8 Proceso de muestras para microscopía electrónica de Barrido.

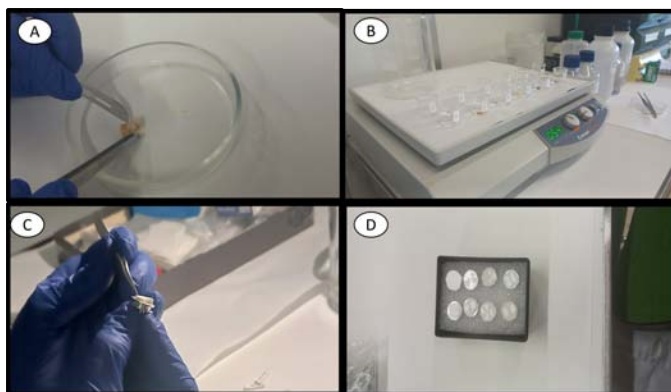


Figura 48 Preparación de muestra para microscopía electrónica de barrido. **A.** Tallado de la muestra con bisturí del n° 11. **B** Lavado con agua bidestilada en agitación con balancín. **C.** Montado de las preparaciones sobre platinas de aluminio. **D.** Muestras montadas en platinas de aluminio.

Anexos



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



DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA
PRESENTE

Por este medio informo a Usted que su proyecto:

Estudio de un constructo de 3D de PLA en ingeniería de tejidos óseos

que será sometido a la convocatoria: tesis de licenciatura de: Erika Resendiz Rueda .

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

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU
Los Reyes Iztacala, a los 19 días del mes de enero del 2023

Atentamente

M.C. Federico Sandoval Olvera
Presidente

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, R. N., Ochoa, D. S., Méndez, A. A., Valencia, M. S. R., & Rodríguez, E. (2021). Regeneración Ósea y Plasma Rico en Plaquetas en Ingeniería de Tejidos. Revisión. *Ciencia en la frontera*. <https://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/cienciafrontera/article/view/3548>

Arreola Esquivel, I., Trejo Iriarte, C. G., Universidad, N. A. de M., & Universidad, N. A. de M. (2022). *Biocompatibilidad de un constructo tridimensional de pla para su uso en ingeniería de tejidos*.

Barreto, A., & F, J. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: Una introducción. *RET. Revista de estudios transdisciplinarios*, 1(2), Article 2.

Batista Cruzado, A. (2015). *Efecto en la regeneración ósea guiada de una membrana de PLGA modificada a nivel microtopográfico con plasma de oxígeno y funcionalizada con una capa inorgánica de óxido de silicio* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de Sevilla]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=46729>

Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641-648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>

Brennan-Speranza, T. C., & Conigrave, A. D. (2015). Osteocalcin: An Osteoblast-Derived Polypeptide Hormone that Modulates Whole Body Energy Metabolism. *Calcified Tissue International*, 96(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9931-y>

Bunnell, B. A. (2021). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 10(12), 3433. <https://doi.org/10.3390/cells10123433>

Chen, H., Shi, Q., Shui, H., Wang, P., Chen, Q., & Li, Z. (2021). Degradation of 3D-Printed Porous Polylactic Acid Scaffolds Under Mechanical Stimulus. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.691834>

Chimal, J., Rodríguez-Molina, V., Acevedo, J. J., & Santa Olalla Tapia, J. (2013). *Células troncales neurales* (pp. 89-117).

Clavijo Penagos, J. I. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3(3), 133-146.

De Bari, C., Dell'Accio, F., Vandenabeele, F., Vermeesch, J. R., Raymackers, J.-M., & Luyten, F. P. (2003). Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *Journal of Cell Biology*, 160(6), 909-918. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212064>

Dhawan, U., Jaffery, H., Salmeron-Sanchez, M., & Dalby, M. J. (2022). An ossifying landscape: Materials and growth factor strategies for osteogenic signalling and bone regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 355-363. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.010>

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, 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>

Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., & Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382(6590), 448-452. <https://doi.org/10.1038/382448a0>

Estrada, C., Paz, A. C., & López, L. E. (2006). INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO: CONSIDERACIONES BÁSICAS. *Revista EIA*, 5, 93-100.

Fang, X., Murakami, H., Demura, S., Hayashi, K., Matsubara, H., Kato, S., Yoshioka, K., Inoue, K., Ota, T., Shinmura, K., & Tsuchiya, H. (2014). A novel method to apply osteogenic potential of adipose derived stem cells in orthopaedic surgery. *PloS One*, 9(2), e88874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088874>

Fariña, G. I. G. (2003). *Procedimientos básicos para el laboratorio de apoyo y diagnóstico*. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Garrido Fariña, G. I. (2019). *Principios de Microtecnia*.

Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249-1260. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>

Granados-Hernández, M. V., Serrano-Bello, J., Montesinos, J. J., Alvarez-Gayosso, C., Medina-Velázquez, L. A., Alvarez-Fregoso, O., & Alvarez-Perez, M. A. (2018). In vitro and in vivo biological characterization of poly(lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(6), 2435-2446. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34053>

Guduric, V., Metz, C., Siadous, R., Bareille, R., Levato, R., Engel, E., Fricain, J.-C., Devillard, R., Luzanin, O., & Catros, S. (2017). Layer-by-layer bioassembly of cellularized polylactic acid porous membranes for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 28(5), 78. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5887-6>

Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E., & Gundberg, C. M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews*, 69(3), 990-1047. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.990>

He, Q., Wan, C., & Li, G. (2007). Concise Review: Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Blood. *Stem Cells*, 25(1), 69-77. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0335>

Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>

Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2019). Preface Harrison's Manual of Medicine. *Asia Book Registry*. <https://bookregistry.asia/book/index.php/abr/article/view/22>

Kemp, K. C., Hows, J., & Donaldson, C. (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia & Lymphoma*, 46(11), 1531-1544. <https://doi.org/10.1080/10428190500215076>

Liao, H.-T., & Chen, C.-T. (2014). Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 288-295. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.288>

Liao, S., Chan, C. K., & Ramakrishna, S. (2008). Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 28(8), 1189-1202. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.015>

Liu, X., Gao, J., Cui, X., Nie, S., Wu, X., Zhang, L., Tang, P., Liu, J., & Li, M. (2023). Functionalized 3D-Printed PLA Biomimetic Scaffold for Repairing Critical-Size Bone Defects.

Bioengineering (Basel, Switzerland), 10(9), 1019.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering10091019>

López, M., & David, C. (2019). *Ingeniería de tejidos, generalidades y actualidad en Odontología*.
<https://hdl.handle.net/20.500.12494/15222>

Majidinia, M., Sadeghpour, A., & Yousefi, B. (2018). The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 2937-2948.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26042>

Martínez Blázquez, A. (2023). *Diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo mediante un mecanismo de nanovibración*. <https://doi.org/10/60204>

Martin-Piedra, A., & Martin-Piedra, L. (2019). Matrices para Ingeniería del tejido óseo. *Actualidad Médica*, 806. <https://doi.org/10.15568/am.2019.806.re01>

Mazini, L., Ezzoubi, M., & Malka, G. (2021). Overview of current adipose-derived stem cell (ADSCs) processing involved in therapeutic advancements: Flow chart and regulation updates before and after COVID-19. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-02006-w>

Melek, L. N. (2015). Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. *Tanta Dental Journal*, 12(3), 211-223. <https://doi.org/10.1016/j.tdj.2015.05.003>

Meruane, M., & Rojas, M. (2010). Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo. *International Journal of Morphology*, 28(3), 879-889. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022010000300035>

Morales Restrepo, D. S. (2011). *Detección de la proteína ósea colágeno tipo I alfa1 de células osteogénicas por la técnica de Western Blot*. <https://repository.eia.edu.co/entities/publication/24d56e80-c2fe-4663-80e4-c4fd6f860e92>

Moreno, G. R. (2008). *Medicina regenerativa y terapia celular: Informe de vigilancia tecnológica*. Genoma España.

Murphy, C. M., & O'Brien, F. J. (2010). Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*, 4(3), 377-381.
<https://doi.org/10.4161/cam.4.3.11747>

Perán, M., García, M. A., Lopez-Ruiz, E., Jiménez, G., & Marchal, J. A. (2013). How Can Nanotechnology Help to Repair the Body? Advances in Cardiac, Skin, Bone, Cartilage and Nerve Tissue Regeneration. *Materials*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ma6041333>

Pérez Millán, M. I., & Lorenti, A. (2006). Células troncales (stem cells) y regeneración cardíaca. *Medicina (Buenos Aires)*, 66(6), 574-582.

Petre, D. G., & Leeuwenburgh, S. C. G. (2022). The Use of Fibers in Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 28(1), 141-159. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0252>

Pojda, Z. (2015). Adipose-Derived Stem Cells for Therapeutic Applications. En N. Bhattacharya & P. G. Stubblefield (Eds.), *Regenerative Medicine: Using Non-Fetal Sources of Stem Cells* (pp. 77-89). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6542-2_9

Rather, H. A., Jhala, D., & Vasita, R. (2019a). Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109761. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109761>

Roldán Vasco, S., Vargas Isaza, C. A., Mejía Suaza, M. L., Zapata Giraldo, J., & Moncada Acevedo, M. E. (2016). *Ingeniería de tejidos y aplicaciones*. Instituto Tecnológico Metropolitano. <https://doi.org/10.22430/9789588743844>

Roosa, S. M. M., Kemppainen, J. M., Moffitt, E. N., Krebsbach, P. H., & Hollister, S. J. (2010). The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A(1), 359-368. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32381>

Rubert, M., De la Piedra, C., Rubert, M., & De la Piedra, C. (2020). La osteocalcina: De marcador de formación ósea a hormona; y el hueso, un órgano endocrino. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 12(4), 146-151. <https://doi.org/10.4321/s1889-836x2020000400007>

Sahar, D. E., Walker, J. A., Wang, H. T., Stephenson, S. M., Shah, A. R., Krishnegowda, N. K., & Wenke, J. C. (2012). Effect of endothelial differentiated adipose-derived stem cells on vascularity and osteogenesis in poly(D,L-lactide) scaffolds in vivo. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 23(3), 913-918. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e31824e5cd8>

Salerno, S., Messina, A., Giordano, F., Bader, A., Drioli, E., & De Bartolo, L. (2017). Dermal-epidermal membrane systems by using human keratinocytes and mesenchymal stem cells isolated from dermis. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 943-953. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.008>

Segura González, E. A. (2016). *Diseño, caracterización y comportamiento en servicio de materiales basados en ácido poliláctico (PLA) con potencial utilidad en el empaquetado de alimentos* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Carlos III de Madrid]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=75158>

Serrato Ochoa, D., Nieto Aguilar, R., & Aguilera Méndez, A. (2015). Ingeniería de tejidos: Una nueva disciplina regenerativa. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 64, 61-69.

Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S., & Gokhale, D. V. (2019). Polylactic acid: Synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology*, 127(6), 1612-1626. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>

Sordi, M. B., Curtarelli, R. B., da Silva, I. T., Fongaro, G., Benfatti, C. A. M., de Souza Magini, R., & Cabral da Cruz, A. C. (2021). Effect of dexamethasone as osteogenic supplementation in in vitro osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 32(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06475-6>

Su, X., Wang, T., & Guo, S. (2021). Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regenerative Therapy*, 16, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.01.007>

Tajbakhsh, S., & Hajjali, F. (2017). A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 897-912. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.008>

Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y., & Kuboki, Y. (1997). Pore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis. *The Journal of Biochemistry*, 121(2), 317-324.

Tyler, B., Gullotti, D., Mangraviti, A., Utsuki, T., & Brem, H. (2016). Polylactic Acid (PLA) Controlled Delivery Carriers for BioMedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018>

Valencia, A. A. A., Becerril, N. V., Vázquez, F. C. V., Koudriavtsev, T. V., Montesinos, J. J. M., Mayorga, E. A., & Pérez, M. A. Á. (2017). Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA/Hidroxiapatita. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, 18(3), 39-50.

Villarreal Brito, M., Álvarez Pérez, M. A., & Marichi Rodríguez, F. J. (2013). Expresión de la osteocalcina en el ligamento periodontal al inducir fuerzas ortodóncicas. *Revista Odontológica Mexicana*, 17(3), 152-155. [https://doi.org/10.1016/S1870-199X\(13\)72030-5](https://doi.org/10.1016/S1870-199X(13)72030-5)

Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., Nolta, J., Phinney, D. G., & Sensebe, L. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*, 21(10), 1019-1024. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.08.002>

Wang, W., Chen, L., Zhang, C., Yu, Q., & Wang, K. (2011). [Experimental study on osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells treated with different concentrations of dexamethasone]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waikexue zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, 25(12), 1486-1492.

Wang, Z., Han, L., Sun, T., Wang, W., Li, X., & Wu, B. (2021). Construction of tissue-engineered bone with differentiated osteoblasts from adipose-derived stem cell and coral scaffolds at an ectopic site. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 59(1), 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.07.006>

Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., & Uludağ, H. (2018). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 80, 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211-228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>

