



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**CITOCINAS PRESENTES EN LA DIFERENCIACIÓN
IN VITRO DE OSTEÓBLASTOS A PARTIR DE
CÉLULAS TRONCALES INDUCIDA POR MATRIZ
ÓSEA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

CLAUDIA ALEJANDRA ALVARADO OLVERA

ASESORES:

**DRA. NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES
DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES
ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Tesis y Examen Profesional**

Citocinas presentes en la diferenciación *in vitro* de osteoblastos a partir de células troncales inducida por matriz ósea.

Que presenta la pasante: **Claudia Alejandra Alvarado Olvera**
Con número de cuenta: **308175532** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Mayo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes	
1er. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	
2do. SUPLENTE	M. en E. María Verónica Vázquez Cianca	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A mi querida UNAM, principalmente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme la preparación, el cariño hacia los libros y la sed de conocimiento.

A mi asesora la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por haberme brindado la oportunidad y confianza de realizar este proyecto, por su esfuerzo, su dedicación y valiosa dirección; gracias por los conocimientos compartidos conmigo, por la orientación, motivación y amistad, has sido un gran ejemplo para mí Naye no sólo por tus logros profesionales, sino también personales.

Al Dr. Javier Ambrosio por abrimme las puertas de su laboratorio, por los consejos y las oportunidades ofrecidas más allá de este proyecto, por permitirme aprender más, gracias.

A la Dra. Cristina Piña por creer en nuestro trabajo, por todas las facilidades que nos brindó, un gusto haber formado parte del Laboratorio de Biomateriales.

Al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes”, a las Dras. Pilar Flores y Verónica Zaga Clavellina que nos facilitaron las muestras para la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, al Dr. Carlos Núñez Álvarez por permitirme la oportunidad de formar parte temporal de ese bonito equipo de trabajo, al Dr. Diego Hernández Ramírez por el interés mostrado, por alentarme en los días complicados de laboratorio, por su disponibilidad, apoyo y consejos técnicos, muchas gracias.

A la Dra. Luz Alcántara Quintana por su guía y colaboración a la realización de este trabajo.

A la Bióloga Martha Martínez Cisneros, Depto. de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM y al M. en C. Víctor Hugo Rosales, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales LaNSE, CINVESTAV por su valiosa contribución en este proyecto.

A la Bióloga Olivia Reynoso Ducoing por su apoyo técnico en el trabajo de laboratorio.

A las M. en C. Leticia Villavicencio y Cecilia Martínez, gracias por siempre apoyarme en los momentos clave, por los consejos, las buenas pláticas y las sonrisas.

A mis compañeros del laboratorio de biomateriales: Malú mi compañerita de clases de inmuno, a Héctor y Karlita, por la buena vibra y buenos momentos en el laboratorio.

Al programa PAPIME PE211115 por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme llegar a este momento, por permitirme tener y disfrutar a mi familia.

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me han demostrado amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que incluye este. LOS AMO

A mi hermano, porque desde siempre me has brindado tu apoyo haciéndome ver las cosas diferentes y prácticas, por consolarme en los malos momentos. Te adoro Renato y sé que tú también me amas campeón. A Mayra, cuñis gracias por siempre mostrarme tu apoyo en lo que está a tu alcance y en lo que no, te quiero mucho.

A mis amigos, Dan, Prisca, Bris, Drian (dude), Mitzi, y Van, porque el camino es mejor cuando tienes a tu lado personas como ustedes, son de los mejores regalos que me dio la Universidad les agradezco por los grandes lotes de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado.

ÍNDICE.

1.	Abreviaturas	3
2.	Índice de figuras.....	5
3.	Índice de tablas.....	6
4.	Índice de gráficos.....	6
5.	Resumen.....	7
6.	Introducción.....	9
7.	Marco teórico	11
7.1	Hueso.....	11
7.1.1	Células óseas.....	11
7.1.1.1	Osteoblastos	12
7.1.1.2	Osteoclastos	13
7.2	Células Troncales.....	14
7.2.1	Clasificación por origen y potencialidad.....	14
7.3	Células Troncales Mesenquimales.....	15
7.3.1	Ontogenia	15
7.3.2	Fuentes de obtención	16
7.3.3	Criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular para la identificación de Células Troncales Mesenquimales	18
7.3.3.1	Adherencia de las Células Troncales Mesenquimales a superficies de cultivo	19
7.3.3.2	Inmunofenotipo	20
7.3.3.3	Diferenciación de Células Troncales Mesenquimales	22
7.4	Diferenciación osteoblástica	23
7.4.1	Inductores solubles	24
7.4.2	Materiales inductores.....	26
7.4.3	Matriz ósea bovina Nukbone	27
7.4.3.1	Composición y estructura.....	27
7.4.3.2	Regeneración ósea.....	28
7.5	Osteoinmunología	29
7.5.1	Citocinas.....	30
8.	Objetivos	32

9.	Hipótesis.....	33
10.	Materiales y métodos.....	34
11.	Resultados	38
12.	Discusión.....	50
13.	Conclusiones	58
14.	Perspectivas.....	60
15.	Referencias	61

1. Abreviaturas

AGM	Aorta-Gónada-Mesonefros
ALP	Fosfatasa alcalina
BMP	Proteínas morfogénicas óseas (nombre en inglés)
β-GP	B-gliserolfosfato
CLG	Colágena
CT	Células Troncales
CTA	Células Troncales Adultas
CTE	Células Troncales Embrionarias
CTH	Células Troncales Hematopoyéticas
CTM	Células Troncales Mesenquimales
CTM-MA	Células Troncales Mesenquimales derivadas de Membrana Amniótica
EA	Epitelio Amniótico
ERM	Proteínas de enlace a la membrana-citoesqueleto (nombre en inglés)
ES	Estroma
FS	Tamaño celular (<i>Forward Scatter</i>)
GPI	Glicosil-fosfatidilinositol (nombre en inglés)
HA	Hidroxiapatita
HBsAg	Antígeno de superficie de la Hepatitis B (nombre en inglés)
H-DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco con alta glucosa adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino inactivado
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular (<i>International Society Cellular Therapy</i>)
JAK's	Familia de proteínas Janus Cinasa (nombre en inglés)
MA	Membrana amniótica

MB	Membrana Basal
MEC	Matriz Extra Celular
MKP-1	Proteincinasa activada por mitogeno-1 (Mitogen-activated protein kinase-1)
MO	Médula Ósea
NKB	Matriz ósea bovina Nukbone®
OC	Osteocalcina
ON	Osteonectina
OP	Osteopontina
PBS	Amortiguador de Fosfatos (nombre en inglés)
PLGA	ácido poli(láctico-co-glicólico) (nombre en inglés)
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
SFB	Suero Fetal Bovino
SSC	Complejidad interna (<i>Side Scatter</i>)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante (Transforming growth factor) beta 1
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral (nombre en inglés)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VHC	Virus de Hepatitis C
VIH	Virus de I inmunodeficiencia humana

2. Índice de figuras

Fig. 1.	Esquema de una sección de hueso largo.	12
Fig. 2.	Representación esquemática de células óseas.	13
Fig. 3.	Membranas fetales humanas.	18
Fig. 4.	Osteoblastogénesis	24
Fig. 5.	Diferenciación osteogénica	25
Fig. 6.	Estructura de la matriz ósea bovina (Nukbone)	28
Fig.7.	Histología de membrana amniótica Humana.	38
Fig. 8.	Células Troncales Mesenquimales	39
Fig. 9.	Células Troncales Mesenquimales teñidas con May-Grünwald Giemsa	40
Fig. 10.	Ensayo de clonogenicidad celular	41
Fig. 11.	Potencial osteogénico. .	42
Fig. 12.	Evaluación de la proliferación celular.	44

3. Índice de tablas

Tabla 1	Características de las Células Troncales de acuerdo a su potencialidad.	15
Tabla 2	Inductores de diferenciación de las Células Troncales Mesenquimales.	23
Tabla 3	Marcadores utilizados en la citometría de flujo de las Células Troncales Mesenquimales.	36

4. Índice de gráficos

Gráfico 1	Clonogenicidad celular.	41
Gráfica 2	Inmunofenotipo mediante citometría de flujo.	43
Gráfico 3	Proliferación Celular en presencia de Nukbone.	45
Gráfico 4	Cuantificación de citocinas proinflamatorias por luminometría.	47
Gráfico 5	Cuantificación de citocinas antiinflamatorias por luminometría	48
Gráfico 6	Cuantificación IL-6 por luminometría.	49

5. Resumen

La pérdida de la continuidad ósea por diferentes causas tiene una alta incidencia en centros hospitalarios de primer nivel en México, donde se comienza a emplear biomateriales cuya labor es promover la reparación y/o regeneración ósea mediante la inducción de la adhesión de células troncales y su diferenciación osteoblástica sobre el biomaterial. Tal es el caso de la matriz ósea Nukbone (NKB), el cual es un biomaterial con características osteoconductoras e osteoinductoras demostradas a nivel de expresión génica, sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción de este biomaterial, así como la posible participación de aspectos osteoinmunológicos que cursen con activación de citocinas proinflamatorias y/o antiinflamatorias que pudieran estar participando en el proceso de regeneración ósea mediado por NKB.

En este contexto, la osteoinmunología es la ciencia que estudia la interacción a nivel molecular de los sistemas esquelético e inmunológico. Hasta ahora lo que se conoce sobre esta disciplina es la participación de algunas citocinas, así como transductores de señalización que tienen lugar en la regulación entre las células inmunes y óseas. En un principio, la osteoinmunología se enfocaba principalmente en describir la comunicación de estos sistemas en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, sin embargo, actualmente esta disciplina se ocupa de esclarecer el vínculo entre el sistema inmune y procesos como el recambio óseo y la cicatrización.

Con estos antecedentes, el presente trabajo se enfocó en la identificación de las principales citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IFN- γ y TNF- α) involucradas en la diferenciación *in vitro* de Células troncales mesenquimales derivadas de membrana amniótica humana (CTM-MA) hacia el linaje osteoblástico inducidas por NKB, con la finalidad de comprender el mecanismo por el cual este biomaterial favorece la regeneración ósea. Para tal efecto, las CTM-MA se obtuvieron por digestión enzimática, se caracterizaron por medio de ensayo clonogénico, multipotencialidad e inmunotipificación, y se determinaron aspectos celulares como la proliferación, conformación morfológica y el perfil de citocinas secretadas durante la diferenciación osteoblástica.

Los resultados demostraron que las CTM-MA cultivadas en presencia de la NKB secretaron una mayor concentración de citocinas proinflamatorias después del día 14, a comparación de las células cultivadas sin el biomaterial. Este efecto puede estar mediando la activación del proceso de diferenciación osteoblástica que promueve el biomaterial.

6. Introducción

La osteoimmunología, es una disciplina en expansión, desde su origen en el año 2000, esta disciplina se centra en el estudio de las interacciones moleculares entre células óseas e inmunes, así como de los mecanismos de regulación relacionados [1-3]. Hasta ahora, esta disciplina ha contribuido a esclarecer la participación de algunas citocinas, así como transductores de señalización que tienen lugar en la regulación entre células inmunes y óseas. Estas moléculas regulan la conducta celular del hueso durante procesos inflamatorios, infecciosos o durante la cicatrización, todo ello a través de la modulación de respuestas celulares anabólicas y catabólicas [1]. No obstante, la información sobre este aspecto es escasa, debido a que su estudio se ha centrado principalmente al estudio del vínculo entre los osteoclastos y células inmunes [2], dejando de lado la búsqueda de los efectos sobre los osteoblastos, al existir poca información detallada sobre el patrón de producción de citocinas de esta estirpe celular, la cual es la principal formadora de hueso.

En este sentido, es importante realizar estudios sobre el perfil de citocinas y factores de crecimiento que activen y/o produzcan los osteoblastos, dado que estas células son las responsables de la síntesis de hueso y de la remodelación ósea debido a la modulación que ejercen sobre la actividad osteoclástica y sobre el proceso de diferenciación osteoblástica. La estimulación de la diferenciación osteoblástica es una capacidad que poseen algunos inductores como los provenientes de la matriz extracelular (MEC) como colágena tipo I (CLG-I), osteonectina (ON) y osteopontina (OP); también algunos factores solubles poseen la capacidad de estimular este proceso, como los factores de crecimiento, siendo uno de los más potentes las proteínas morfogénicas óseas (BMP) y por último factores químicos como dexametasona, ácido ascórbico y el β -glicerolfosfato inducen a diferentes niveles la diferenciación osteoblástica [4, 5]. De manera conjunta, existen biomateriales que inducen esta diferenciación, uno de los cuales es la matriz ósea bovina Nukbone® (NKB), una matriz que está compuesta por cristales nanométricos de hidroxiapatita (HA), asentados sobre CLG-I [6]. Este biomaterial es utilizado como xenoimplante

en el tratamiento de defectos óseos, como fracturas y fisuras, de igual forma en odontología se emplea como relleno óseo, en ortopedia como relleno en huesos largos, vértebras, maxilares; también se emplea como relleno de globo ocular [7]. En México los accidentes y las enfermedades crónico-degenerativas son problemas de salud pública, que de acuerdo con estudios estadísticos, incrementará hasta en un 40%, tan sólo la incidencia de fracturas de cadera para el año [38]. El gran número de personas afectadas por lesiones discapacitantes, así como las consecuencias que esas lesiones tienen en quienes las padecen han concitado la atención de la comunidad científica, en la búsqueda biomateriales óseo regenerativos como NKB, que si bien es cierto ha demostrado propiedades osteoconductoras y osteoinductoras, el conocimiento acerca del perfil de citocinas que induce este material al catalizar el proceso de diferenciación osteoblástico aún no ha sido develado.

7. Marco teórico

7.1. Hueso

El hueso es un tejido conectivo duro compuesto principalmente por fibras de CLG-I mineralizadas con cristales de fosfato de calcio, este tejido posee un diseño que le proporciona la microarquitectura ideal para su alta vascularización e inervación, además de otorgarle el soporte mecánico que requiere. En el hueso tienen lugar una gran variedad de funciones metabólicas, por lo que es considerado un tejido dinámico al sufrir una continua reparación y remodelación [8-10].

Existen dos tipos de arquitecturas óseas las cuales están determinadas por la disposición de las laminillas compuestas por matriz osteoide calcificada. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers en los cuales discurren vasos sanguíneos y nervios, recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos, estos pequeños orificios también son conocidos como lacunas y todo esto en conjunto se denomina osteona o sistema de Havers. Los canales de Havers se comunican mediante canales transversales denominados canales de Volkmann. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares ocupados por elementos hematopoyéticos (médula ósea). (Fig. 1) Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral. [8]

7.1.1. Células óseas

En el hueso coexisten varios tipos de células que se pueden encontrar dentro del propio tejido óseo como en el estroma conjuntivo de la médula ósea. Las células pertenecientes a este último son las Células Troncales Mesenquimales (CTMs), Células Troncales Hematopoyéticas (CTHs), adipocitos, macrófagos, mastocitos y células endoteliales [8]. En cuanto al propio tejido se encuentran presentes cuatro tipos de células óseas: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

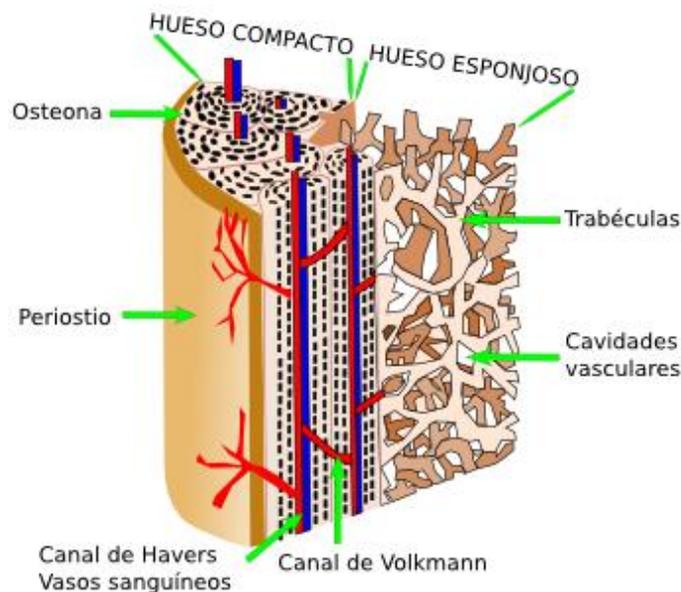


Fig. 1. Esquema de una sección de un hueso largo. El esquema muestra la organización y localización del hueso compacto y del esponjoso. (Molist, P. *et. al.*, 2014) [10].

7.1.1.1. Osteoblastos

Son las células formadoras de matriz del hueso en crecimiento y maduro con vida media de 1 a 10 semanas, debido a su labor secretora poseen un núcleo grande claro, un retículo endoplásmico rugoso (RER) bien desarrollado, gran cantidad de ribosomas libres y un aparato de Golgi voluminoso, (Fig. 2) estos organelos participan en la producción de proteínas de la matriz ósea como CLG-I, osteocalcina (OC, osteonectina (ON) y diversos factores de crecimiento. Con el objeto de comunicarse con la red de osteocitos y osteoblastos vecinos utilizan proteínas de membrana que permiten la entrada a una serie de mensajeros como calcio, hormonas, citocinas, vitaminas y proteínas morfogénicas óseas (BMP) [8, 12, 13].

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica que inicialmente al no estar calcificada es nombrada como tejido osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día, con una vida media de alrededor de 10 días, asimismo expresan la fosfatasa alcalina (ALP) enzima característica que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día [8, 13]. Otra actividad primordial de los osteoblastos es modular la reabsorción ósea a

través de la regulación de la actividad osteoclástica, esta regulación es efectuada mediante la síntesis de citocinas específicas [13].

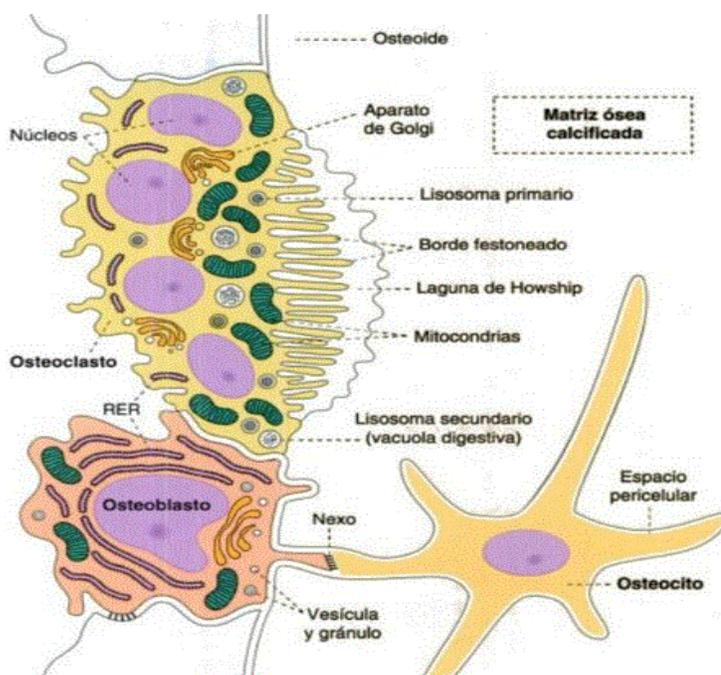


Fig. 2. Representación esquemática de células óseas. (Sobotta, W., 2008.) [11].

A medida que la mineralización continúa los osteoblastos quedan inmersos en la matriz, en este punto del proceso de mineralización ósea, los osteoblastos pueden tomar tres direcciones: 1) morir por apoptosis (20%), 2) formar parte de las células limitantes o de revestimiento o 3) diferenciarse en osteocitos (15%), llegando así a los estadios más avanzados de maduración. Los osteocitos se encuentran en las lacunas osteocíticas rodeados de tejido mineralizado duro lo que irrumpe su capacidad migratoria, no por ello dejan de desempeñar un importante papel en el tejido óseo, ya que se encargan de la transmisión de información sobre el estado interno del hueso hacia la superficie [8, 14, 15].

7.1.1.2. Osteoclastos

En el proceso perpetuo de remodelado y neosíntesis de la matriz ósea los osteoclastos realizan la resorción de la matriz calcificada [12]. Los osteoclastos tienen estructuras especializadas en la membrana: un borde en cepillo característico de los osteoclastos activos, que es donde tiene lugar la reabsorción,

para tal efecto, en sus cercanías se encuentran muchas mitocondrias y lisosomas; y una zona clara, rica en microfilamentos de actina con integrinas que sirven de anclaje a la MEC (Fig. 2). En este sitio se crea una zona de sellado llamado compartimiento subosteoclástico, es aquí donde se produce la reabsorción por acidificación y proteólisis por hidrolasas ácidas de la matriz ósea y cristales de HA [8].

Respecto a la osteoclastogénesis actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas [8].

7.2. Células Troncales

Las células troncales (CT) también conocidas como células progenitoras (del inglés *stem cells*, tronco) se definen como células indiferenciadas con capacidad de diferenciarse ante determinadas señales en diversos tipos de células especializadas tanto morfológica como funcionalmente, asimismo son capaces de autorrenovarse.

Su estudio se inició a principios de la década de 1970, cuando Till y McCulloch y más tarde Becker y colaboradores observaron que algunas células de la médula ósea (MO) podían generar todos los tipos de células hematopoyéticas *in vivo* [16].

7.2.1. Clasificación por origen y potencialidad

Las CT pueden clasificarse atendiendo a su origen en células troncales adultas (CTA) obtenidas de un organismo completamente desarrollado y células troncales embrionarias (CTE) provenientes de carcinomas embrionarios o embriones producidos por fertilización [17]. Aunada a esta clasificación se encuentra también la basada en su potencialidad que se menciona a continuación.

La clasificación más común de las CT se fundamenta en la capacidad de potencialidad que tienen para originar células de diferentes estirpes, lo cual está

relacionado con el grado de diferenciación de las CT como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Característica de las Células Troncales de acuerdo a su potencialidad (*Mata-Miranda, M., 2013 y Anzaldúa, A., et. al., 2007*) [17].

Característica	Descripción
Totipotenciales	Únicamente el cigoto y las descendientes de las dos primeras divisiones son células totipotenciales ya que tienen la capacidad de formar tanto el embrión como tejidos extraembrionarios (membranas extrafetales)
Pluripotenciales	A los cuatro días, las células totipotenciales empiezan a diferenciarse, formando el blastocisto y la masa celular interna. Las células de la masa celular interna son consideradas pluripotenciales y pueden diferenciarse en las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero pierden la capacidad de formar tejidos extraembrionarios .
Multipotenciales	Capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas de acuerdo a su localización. Pueden autorrenovarse repetidamente para formar un tejido.
Unipotenciales	Son capaces de generar un solo tipo de célula.

7.3. Células Troncales Mesenquimales

Las CTMs son CT que fueron caracterizadas en la década de los años 60's con los trabajos realizados por A. Friedenstein y colaboradores quienes las aislaron de MO y las describieron como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos, entre otros [18].

7.3.1. Ontogenia

Tras la fecundación del óvulo y el espermatozoide comienza la primera etapa del desarrollo embrionario: la segmentación, que consiste en una serie de divisiones mitóticas y procesos bioquímicos que conducen al estadio conocido como blastocisto. Éste sufre continuas divisiones que resultan en diferentes estructuras

embrionarias, entre ellas el epiblasto, el cual en la tercera semana durante la gastrulación da origen a las tres capas germinativas: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. Es a partir de la capa mesodérmica que se originarán la lámina lateral, el mesodermo praxial y el mesodermo intermedio, siendo este último donde tienen origen las CTM y las CTH que rodean a la aorta en una región denominada aorta-gónada-mesonefros (AGM) dado que posee el microambiente necesario para alojar a ambas células a través de una coordinación funcional entre ellas [19].

7.3.2. Fuentes de obtención

Las CTM residen en diversos tejidos, las primeras se aislaron a partir de MO aproximadamente hace cuatro décadas, desde entonces se ha considerado a este órgano como la principal fuente de obtención de dichas células [20]. No obstante la MO como fuente de aislamiento de estas células presenta limitantes considerables dado que el procedimiento de obtención es invasivo, tiene una baja tasa de aislamiento (el 0.003% de células mononucleares son CTM) [25], la disminución en la capacidad de proliferación y de diferenciación celular según la edad del donante; razones por las cuales fuentes alternativas como la sangre de cordón umbilical (SCU) y tejido adiposo (TA) se han aceptado para el aislamiento y cultivo de estas células.

De igual manera tanto la SCU y el TA conllevan inconvenientes, la primera a pesar de contar con un 100% de potencial de diferenciación osteogénica posee una baja tasa de aislamiento (30 – 35%) [25], requiere de un volumen mínimo de 30 mL de muestra y presenta el inconveniente de su incapacidad de diferenciación hacia linaje adipogénico. Por otro lado, las células provenientes del TA a pesar de ser obtenidas a través de un método no invasivo de aislamiento, solo exhiben potencial de diferenciación hacia el linaje hematopoyético y no hacia el mesenquimal [19].

Hoy en día se ha demostrado la presencia de CTM en tejidos como cartílago, periostio, sinovia, líquido sinovial, músculo, tendones, endotelio vascular, tejido nervioso, páncreas, hígado, líquido amniótico, sangre periférica, dermis, pulmones, pulpa dental, timo, bazo, cerebro y placenta [19]. Las CTM de estos tejidos se han aislado y caracterizado, de manera particular, las CTM de tejidos neonatales han

llamado recientemente la atención, debido a su baja controversia ética, su fácil acceso y alto contenido de CTM. Estos tejidos incluyen la membrana amniótica (MA) y la membrana coriónica, la placenta, gelatina de Wharton y el cordón umbilical [23].

En este sentido, las membranas fetales que rodean al feto están constituidas por dos membranas que se encuentran adosadas, la amniótica y la coriónica. La membrana amniótica (MA) es una estructura biológica traslúcida que no tiene nervios, músculos o vasos linfáticos. El grosor de esta membrana varía de 0.02 mm a 0.5 mm y consiste en tres capas: la capa epitelial, la membrana basal y el tejido mesenquimal avascular. La capa interna adyacente al líquido amniótico, está constituida por una capa homogénea de células cuboidales adosada a la membrana basal, la cual a su vez está unida a una capa acelular compuesta por CLG-I, II y V. Por fuera de ésta se encuentra un recubrimiento de células estromales de tipo fibroblastos y escasos macrófagos, incrustados en una malla de fibras reticulares. Más externamente, se encuentra una capa muy variable en espesor, que es la capa intermedia o esponjosa, rica en elastina, proteoglicanos, glucoproteínas y fibras de CLG-III, que separan el amnios del corion. Por otro lado, el corion, es la zona histológica más gruesa de las membranas fetales y tiene mayor celularidad que el amnios. La porción final del corion se adosa con la decidua interna como se muestra en la Figura 3 [24,40].

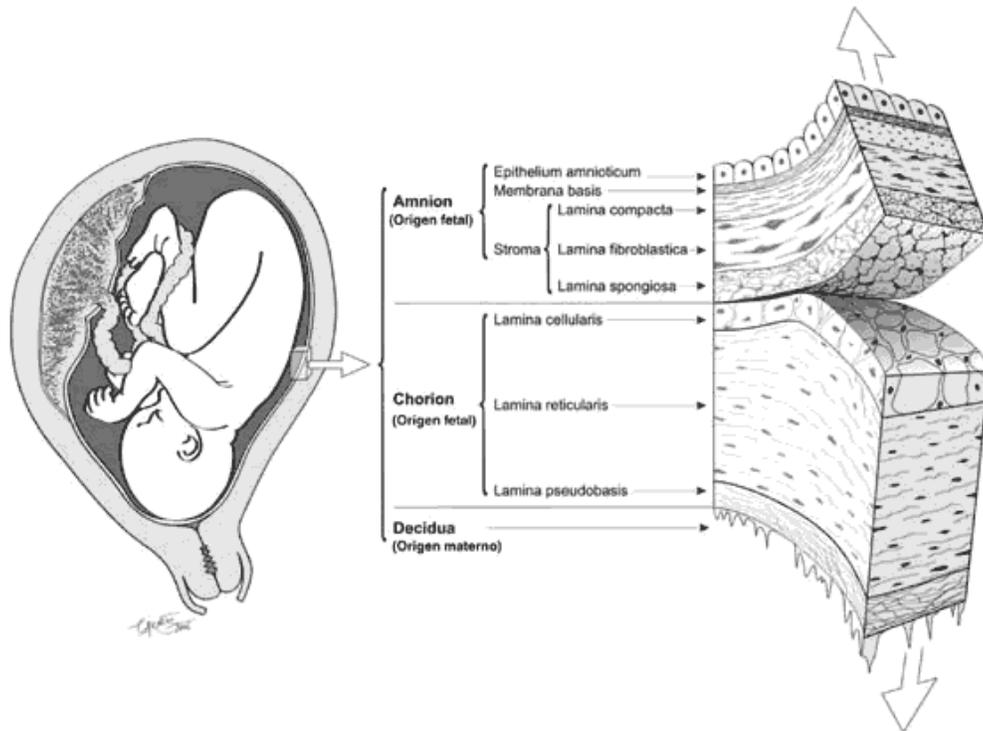


Fig. 3. Membranas fetales humanas. Se muestra la membrana amniótica a término: capa interior que rodea al feto, compuesta por células epiteliales y troncales mesenquimales amnióticas; el corion: externamente se une a la decidua, compuesto por CTM coriónicas y células trofoblásticas coriónicas; decidua: parte materna de la placenta. (SPA electrónico Latinoamérica) [25]

7.3.3. Criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular para la identificación de Células Troncales Mesenquimales

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios para definir a las CTM: adherencia en cultivo; expresión de antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de hematopoyéticos CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y capacidad de diferenciación hacia linajes mesenquimales *in vitro* como osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo.

Adicional a lo propuesto por ISCT, es necesario que cumplan con dos criterios adicionales para poder clasificarlas como CT; que las CTM realicen procesos de autorrenovación, es decir, que durante la división celular solo una de las células hijas inicie programas de diferenciación celular, y además que sean capaces de

desarrollar plasticidad clonogénica y diferenciación hacia tejidos de capas embrionarias diferentes a mesodermo como ectodermo y endodermo [26].

7.3.3.1. Adherencia de las Células Troncales Mesenquimales a superficies de cultivo

La adherencia de las CTM a superficies plásticas de cultivo, es uno de los criterios establecidos por la ISCT para caracterizar a las CTM, debido a que las CTH no presentan esta característica, por lo que la adherencia es el método convencional de selección.

Las propiedades de las superficies plásticas de cultivo para permitir la adherencia *in vitro* de las células, se relaciona con las interacciones moleculares y la topografía de dichas superficies. El proceso de la interacción celular con la materia es altamente dinámico y depende de varios factores que repercuten en la respuesta celular; todo el proceso se puede dividir en diversos eventos celulares.

El primero se refiere al contacto de las células con el fluido o medio de cultivo seguido de la adsorción de las proteínas de superficie al material, lo cual está influenciado por las características de pH, composición iónica y temperatura de la solución, posteriormente ocurre la fase de contacto de las células la cual se produce de manera rápida e intervienen características físico-químicas como fuerzas de Van der Waals. La fase de adhesión celular ocurre en periodos más largos e involucra moléculas de adhesión y remodelación del citoesqueleto, las cuales interactúan de manera sinérgica para inducir una respuesta de proliferación, migración y diferenciación celular [27].

Las CTM expresan una gran variedad de proteínas en la superficie celular que incluyen integrinas, receptores de factores de crecimiento, receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión (ICAM-1,-2,-3, L-selectina, IL-1R, IL-3, VLA-1, entre otras). En este sentido, la adhesión de las células a la superficie del material es regulada por algunas de estas moléculas; la adhesión se realiza desde distintos sitios de contacto, los cuales se clasifican en: contactos focales, contactos cerrados

y contactos de la MEC dependiendo de la distancia entre la célula y el sustrato y la presencia de las proteínas de adhesión [27, 28].

7.3.3.2. Inmunofenotipo

Hasta la fecha no se ha identificado una molécula de superficie específica y/o única de CTM, no obstante, uno de los criterios para identificar las CTM por inmunofenotipo se basa en un panel de anticuerpos monoclonales. El inmunofenotipo aceptado para la identificación de CTM es la coexpresión de CD73, CD90 y CD105, en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45 [26].

Además de los antígenos mencionados anteriormente propuestos por la ISCT, estudios han demostrado que las CTM se caracterizan por expresar moléculas como STRO-1, CD44 y CD166, que son propuestas por algunos autores para la tipificación de células mesenquimales [49, 50], Sin embargo, el potencial de diferenciación osteogénico, condrogénico y adipogénico, depende de la presencia y ausencia de varios de estos marcadores, es decir, que la ausencia de algún marcador mesenquimal no determina estrictamente que las células no sean mesenquimales, ya que hay trabajos que reportan que células positivas para uno, dos o tres marcadores mesenquimales tienen la capacidad de diferenciarse hacia linajes mesodérmicos [47] .

- Estructura y función del CD73, CD90 , CD105, CD44, CD166 y STRO-1

La molécula CD73 también conocida como 5'-ectonucleotidasa, es una proteína de 70 kDa unida a través de un anclaje de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) a la membrana extracelular, donde cataliza la hidrólisis de monofosfatos de nucleósidos extracelulares a sus correspondientes nucleósidos, lo cual permite la entrada de adenosina, inosina y guanosina a la célula, para su posterior conversión en ATP y GTP. Recientemente se ha asociado a mecanismos de adhesión celular debido a que co-expresa con integrinas, por lo que ha sido reconocido como un mediador de la función celular de CTM [29].

La CD90 o Thy-1 es el miembro más pequeño de la superfamilia de las inmunoglobulinas que participa como molécula de adhesión celular (25-35 kDa). Se expresa en gran variedad de células incluyendo CTM, CTH así como en diferentes células en los tejidos linfoides tales como fibroblastos, neuronas y células endoteliales activadas. Se ha relacionado con procesos de inflamación y cicatrización a través de la síntesis y liberación de factores de crecimiento, citocinas y componentes de la MEC para ayudar a la reparación del tejido dañado. CD90 juega un papel en las interacciones célula-matriz y célula-célula a través de la modulación de los mediadores inflamatorios de la respuesta inmune [30].

La molécula CD105 (endoglina) es una glicoproteína de 180 kDa, fosforilada que atraviesa la membrana de las células, el complejo externo se une al Factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) que es una citocina implicada en la proliferación, diferenciación y migración celular. En algunos estudios se ha demostrado que CD105 regula la expresión de ciertos componentes de la MEC como fibronectina, colágena e inhibidor del activador del plasminógeno 1 [27].

Por otro lado, la molécula CD44 es una proteína transmembranal que posee un peso molecular de 37 kDa y forma parte de la familia de los receptores hialurónicos. Se puede asociar a miembros de la familia ERM (proteínas de enlace a la membrana-citoesqueleto). La CD44 es el receptor extracelular principal para glucosaminoglicanos y ácido hialurónico; también se ha reportado que esta proteína se une a CLG, laminina y fibronectina. Entre sus funciones se encuentra mediar señales co-estimuladoras, adhesión, migración, presentación de factores de crecimiento y citocinas. Se expresa en la mayoría de los linfocitos, además de monocitos, granulocitos, timocitos, fibroblastos y CTM [51].

También conocida como molécula de adhesión celular activadora de leucocitos, la CD166, es una proteína que cuenta con un peso molecular de 100-105 kDa. Estudios realizados sugieren que CD166 tiene un papel importante en la hematopoyesis involucrando a las CTM, ya que la proliferación y diferenciación de las CTH depende de la asociación con las CTM presentes en el estroma medular, las cuales generan una diversidad de factores reguladores incluyendo citocinas y

factores de crecimiento que mantienen interacciones adhesivas esenciales para la supervivencia y función de las CTH. [52]

En 1991 se identificó STRO-1 como un antígeno específico para la identificación de CTM presentes en el estroma medular, convirtiéndose en un posible marcador específico para este tipo de células. Investigaciones realizadas demuestran que STRO-1 es un marcador que se expresa en el desarrollo temprano de las CTM, cuando conservan completamente su plasticidad y no se han diferenciado a progenitores comprometidos; y su expresión declina cuando genes asociados a la diferenciación y expansión osteogénica como el Factor de unión al núcleo A1 (CBFA1, de las siglas, core binding factor A1) inician la interacción con la OP y OC. Investigaciones recientes se enfocan en el establecimiento de la estructura de STRO-1, para una mayor comprensión de las funciones celulares realizadas por esta molécula. [52]

7.3.3.3. Diferenciación de Células Troncales Mesenquimales

La multipotencialidad o capacidad de diferenciarse en diversos linajes de tipo mesodérmico, como osteoblastos, condrocitos y adipocitos, es otra de las características que define a las CTM como entidades multipotentes en un sistema *in vitro*.

Es importante mencionar que *In't Anker y colaboradores* [42] fueron los primeros en demostrar en el año 2004 la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica de las CTM-MA, más tarde *Portmann-Lanz y colaboradores* demostraron su capacidad de diferenciación miogénica y neurogénica [31].

Tabla 2. Inductores de diferenciación de las Células Troncales Mesenquimales (*Flores, I. 2010*).

[27] La tabla muestra, las tres líneas de diferenciación mesodérmica básicas junto con sus inductores *in vitro*.

Linaje	Inductores
Osteoblástico	<ul style="list-style-type: none"> • Dexametasona • β-glicerolfosfato • Ácido ascórbico
Adipogénico	<ul style="list-style-type: none"> • Dexametasona • Isobutilmetixantina • Insulina • Indometacina
Condrogénico	<ul style="list-style-type: none"> • TGF- β1

7.4. Diferenciación Osteoblástica

La diferenciación osteoblástica se puede caracterizar en tres etapas: 1) proliferación celular y biosíntesis de la MEC, 2) maduración de la MEC y 3) mineralización de la MEC.

Durante la proliferación celular y biosíntesis de la MEC que ocurre entre 10 a 12 días de cultivo, se expresan altamente genes de proteínas asociadas a la biosíntesis de la MEC (CLG-I, fibronectina y TFG- β) cuya expresión posteriormente disminuye a nivel basal. El final de esta etapa es modulado negativamente por la acumulación de CLG-I contribuye al cese de la proliferación celular.

Previo al inicio de la fase de maduración, la MEC modifica su composición y organización, lo que da origen a la mineralización de la MEC, la cual se caracteriza por la expresión máxima de la ALP en el día 21 de cultivo celular. De manera conjunta, las colagenasas, enzimas encargadas de la remodelación de la MEC alcanzan su máxima expresión, catalizando la remodelación ósea.

Finalmente, la mineralización de la MEC se detona a través de la expresión de proteínas como OC, sialoproteína ósea y OP, las cuales alcanzan su máxima expresión hacia los días del 16 al 20 en condiciones *in vitro* [32].

En general, un preosteoblasto avanza a través de tres distintos estadios morfológicos y metabólicos para llegar a ser un osteoblasto maduro y luego un osteocito. Existe una regulación entre cada etapa que ocurre a través de señales fisiológicas que puedan actuar negativa o positivamente (Fig. 4.)

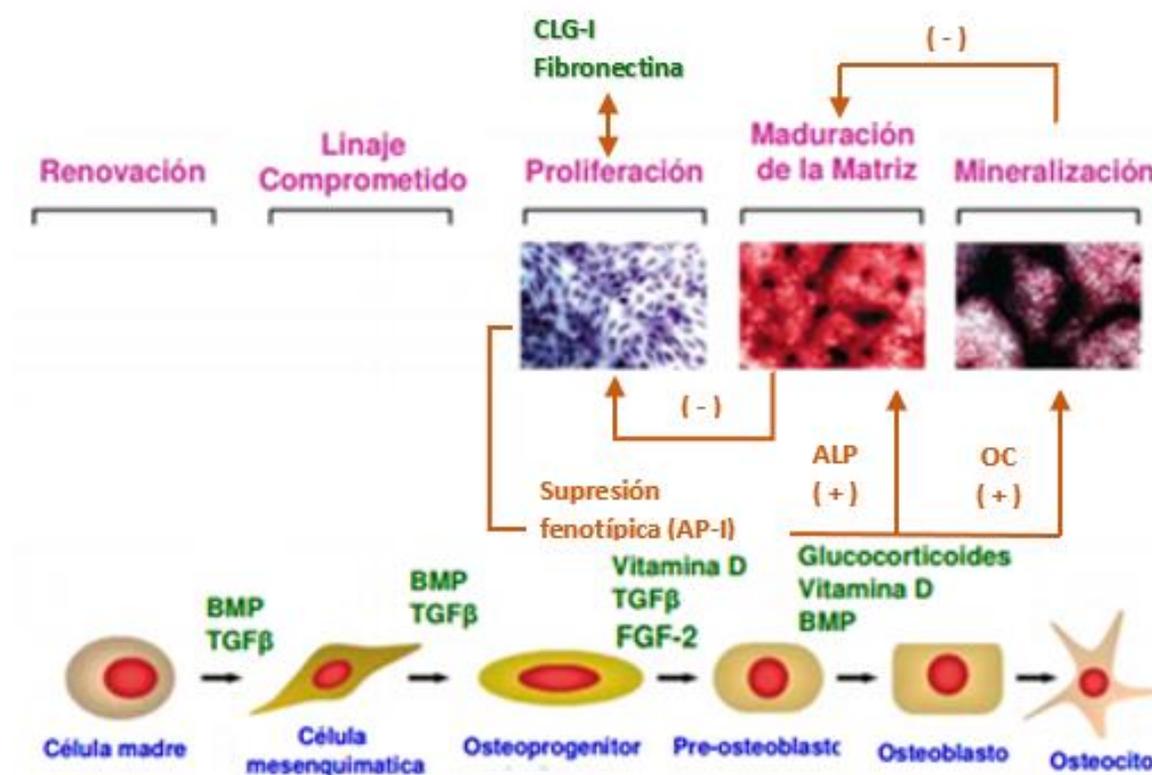


Fig. 4. Osteoblastogénesis. La progresión desde una célula mesenquimal hasta un osteocito es regulada por señales como TGF-β, BMPs, vitamina D y glucocorticoides. Las microfotografías muestran las etapas de proliferación (tinción con Trypan blue), maduración de la matriz extracelular (histoquímica para fosfatasa alcalina), y mineralización (tinción de von Kossa para el contenido de calcio). (Adaptación de Villegas, K. 2008 [33])

7.4.1. Inductores solubles

La diferenciación osteogénica *in vitro* de las CTM se caracteriza por la formación de depósitos de calcio y aumento de expresión de ALP que puede ser activada después de la exposición de las células a dexametasona, βGP y ácido ascórbico (Fig. 5).

La dexametasona es un corticosteroide sintético que posee propiedades antiinflamatorias, inmunosupresoras y reguladoras del calcio sanguíneo, que a concentraciones fisiológicas (10 nM), promueve la diferenciación osteoblástica de las CTM *in vitro*. Esta diferenciación se induce a través de la vía MKP-1 (Mitogen-activated protein kinase-1), la dexametasona regula la fosforilación de CBFA-1, que dirige la diferenciación osteogénica uniéndose a un elemento específico de osteoblastos llamado OSE2, en la región del promotor de los genes diana regulando así, la expresión y activación de los genes de OC y sialoproteína ósea, así como incrementando la actividad de la ALP y la acumulación mineral en las células promoviendo finalmente la diferenciación osteoblástica de las mismas.

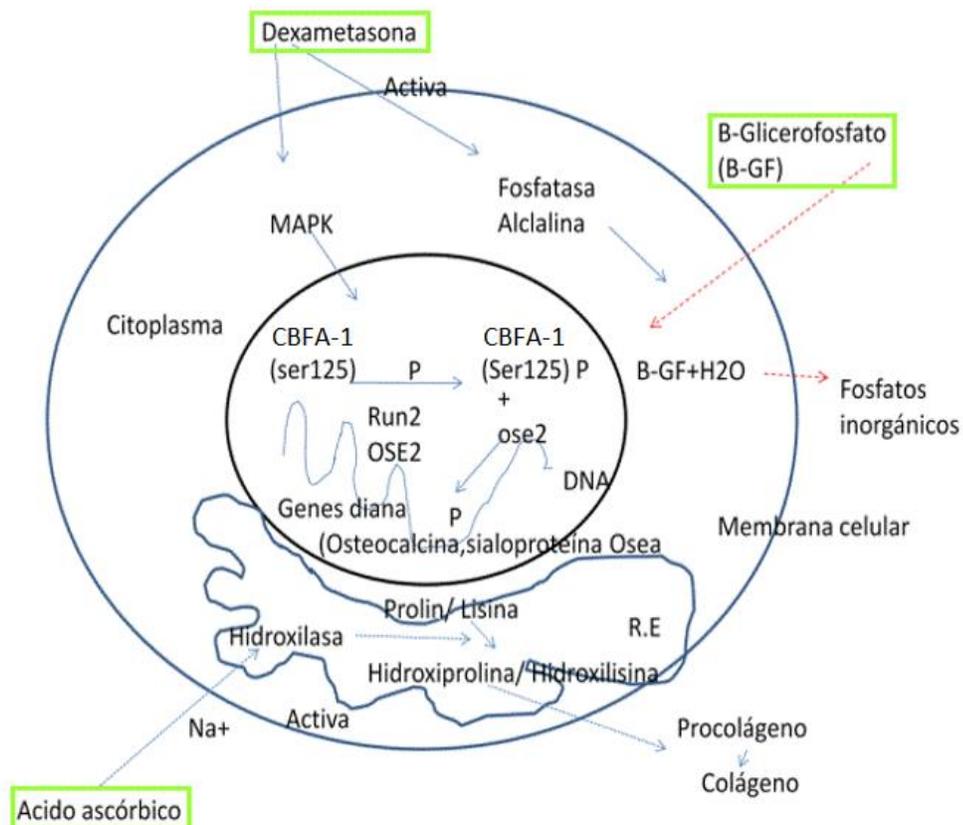


Fig. 5. Diferenciación osteogénica. Se muestran la inducción osteoblástica mediante los factores solubles dexametasona, ácido ascórbico y β-glicerofosfato, que activan el proceso de diferenciación osteoblástica por diversas vías (Flores, I. 2010) [27].

Otro inductor el B-GP es un fosfato orgánico, este compuesto tiene la capacidad de estimular la deposición de calcio en modelos *in vitro*, induciendo la formación de calcio por actuar como sustrato de la ALP ósea, en cuya reacción enzimática se produce un incremento de fosfatos inorgánicos en el medio. El ácido ascórbico es otro suplemento esencial para la diferenciación de CTM a osteoblastos. En cultivos de CTM, el ácido ascórbico estimula la hidroxilación de aminoácidos y procesamiento del procolágena. La síntesis normal de CLG depende de la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente. Las enzimas hidroxilasas, que catalizan esta hidroxilación, requieren ácido ascórbico como cofactor [25].

7.4.2. Materiales inductores

Los materiales inductores o biomateriales “inteligentes” tienen la capacidad de inducir la formación de hueso ectópico a través de la modificación de su entorno, generando así un ambiente adecuado para la formación de hueso. En este sentido, aspectos fisicoquímicos como la composición química, las características nanométricas, micrométricas y macrométricas de la superficie son factores determinantes para que un material posea potencial inductor [34]. Estas características fisicoquímicas dotarán al biomaterial de la capacidad de modular diversas respuestas celulares, incluyendo la adhesión, la supervivencia, progresión del ciclo celular, así como la expresión de fenotipos especializados. Dentro de los biomateriales osteoinductores, se encuentran las cerámicas naturales y sintéticas, como la HA y el fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, así como diversos copolímeros como el PLGA (HA / ácido poli(láctico-co-glicólico) y partículas de oro [34].

Los materiales osteoconductores, permiten el crecimiento celular en su superficie o hacia el interior de su estructura, promoviendo la migración celular y la consecuente formación de hueso, esto se ha visto en biomateriales a base de fosfatos de calcio en forma de cerámica, cementos y recubrimientos, además de alúmina y diversos biovidrios porosos [34,44]. Por otro lado, los materiales osteoinductivos poseen la capacidad de inducir a progenitores osteoblásticos a proliferar y diferenciarse hacia el linaje osteoblástico, siendo un claro ejemplo el NKB. En este sentido, el

biomaterial ideal para tratar defectos óseos, debe poseer, propiedades osteoconductoras y osteoinductoras, debido a que de ambas características dependerá el éxito de la capacidad y adaptación funcional que tenga el xenoinplante insertado en el hueso y la posible regeneración tisular.

Otro factor importante de los materiales inductores, es la topografía. La superficie de algunos biomateriales es un patrón similar al resultado de la resorción ósea . Este patrón superficial permite que la línea de cementación secretada por los precursores osteoblásticos se entrelace con la superficie del biomaterial y asegure la neoformación de hueso. De la misma manera, el recubrimiento de la superficie del implante puede incrementar la adsorción de integrinas, promoviendo la adhesión celular. Esta unión tiene lugar debido al reconocimiento de secuencias proteicas específicas que se encuentran tanto en el citoesqueleto de las células como en el sustrato. La unión de estas secuencias activa vías de señalización que modifican el comportamiento de la célula, activando procesos como la proliferación y la diferenciación celular. De manera conjunta, Damsky y colaboradores han demostrado que las interacciones mediadas por integrinas son esenciales para la supervivencia, proliferación, específica expresión de genes y mineralización de la MEC de los osteoblastos [35, 36, 44].

7.4.3. Matriz ósea bovina Nukbone

7.4.3.1. Composición y estructura

El xenoinjerto de cóndilo femoral bovino liofilizado Nukbone® (NKB) se forma de una matriz extracelular acelular. Dicha matriz está constituida por cristales nanométricos de HA depositados sobre CLG-I, composición que es igual en todos los mamíferos que se caracteriza por formar una red que puede favorecer osteoconducción y/o osteoinducción por células del tejido óseo y tejido muscular. A diferencia de otros biomateriales, el tratamiento químico empleado durante la

obtención de NKB, permite conservar la composición y topografía de su fuente natural [6].

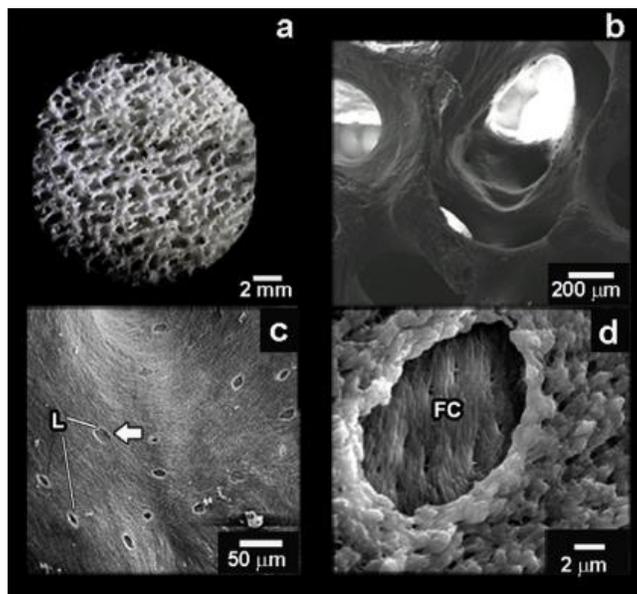


Fig. 6. Estructura de la matriz ósea bovina Nukbone. a) Macroestructura de NKB por medio de microscopio estereoscópico; b-d) micrografías electrónicas de NKB, en b se observa la forma diámetro e interconectividad de poros. En c se muestran las lagunas dentro del poro. En d) una ampliación de la laguna observada en c, permite apreciar las fibras de CLG I. (Rodríguez, N. et al., 2013) [5]

7.4.3.2. Regeneración ósea

NKB, ha demostrado participar en el proceso de regeneración ósea, debido a sus propiedades osteoconductoras e osteoinductoras. En este sentido, estudios realizados *in vivo*, en 2009 demostraron que el implante de NKB se colonizó, con CTM y osteoblastos provenientes del tejido sano en el rededor del implante, a la vez que catalizó la formación de trabéculas y la síntesis de MEC, demostrando así la capacidad de osteoconducción del biomaterial [37]. Este hallazgo, promovió su empleo en el tratamiento de lesiones óseas con pérdidas importantes de hueso como , pseudoartrosis, artrodesis y tumores benignos, demostrando favorables resultados al ser biocompatible y adecuado para patologías donde se requiere aporte óseo. En todos los pacientes el xenoimplante se integró completamente al

hueso, convirtiéndose en hueso de neoformación y sin complicaciones en un período de seguimiento de 2 años [38].

Desde la develación de las propiedades osteoconductoras de NKB, nuevas atribuciones se le han sumado a este biomaterial de acuerdo con *Rodríguez y colaboradores*, quienes demostraron que NKB posee la capacidad de inducir la diferenciación osteoblástica de CTM-MA, dicha capacidad fue evaluada a través de la inducción de la expresión de genes clave del proceso de diferenciación osteoblástica, aunado a estos hallazgos, NKB demostró favorecer la adhesión así como la proliferación celular en un modelo *in vitro*. [5]

Actualmente NKB se usa ampliamente en odontología, ortopedia y cirugía maxilofacial como relleno óseo, , entre otras patologías.

7.5. Osteoinmunología

En las últimas dos décadas, numerosos científicos han puesto en evidencia las interacciones entre las células óseas e inmunológicas, así como los mecanismos de regulación relacionados. Por ejemplo, los osteoclastos se derivan de las mismas células precursoras mieloides que dan lugar a los macrófagos y las células dendríticas. Por otro lado, los osteoblastos regulan nichos de CTH a partir de las cuales se derivan todas las células sanguíneas e inmunitarias. Además de esto, se ha demostrado que diversos mediadores solubles de células inmunes, incluyendo citocinas y factores de crecimiento regulan las actividades de los osteoblastos y los osteoclastos.

Este significativo reconocimiento de las complejas interacciones entre el sistema inmune y el hueso llevó al desarrollo del campo interdisciplinario de la osteoinmunología. Este término, fue utilizado por primera vez en el año 2000 por *Aarón y Choi*, destacando la comunicación que existe entre los sistemas inmune y esquelético especialmente observados en enfermedades inflamatorias autoinmunes. Por otra parte, además del arsenal de moléculas de señalización

mutuas, las células inmunes y de los huesos también comparten un sitio común de origen, la médula ósea. Debido a la proximidad espacial de las células en desarrollo, se propone que se influyen entre sí, no sólo después de la maduración y activación sino en el resto de su existencia. [2,3]

En algunos casos, la pérdida ósea acompañada por trastornos autoinmunes específicos es muy severa, por lo que naturalmente han emergido observaciones clínicas que describen mecanismos por los que las células inmunes y las citocinas inflamatorias median el catabolismo del hueso. Sin embargo, más allá de estos resultados, una comprensión más profunda de las interacciones entre los sistemas inmunitario y esquelético está emergiendo, y los datos recientes demuestran que el sistema inmune puede desempeñar funciones pro-anabólicas. Por otra parte, el papel del esqueleto en el desarrollo de linajes celulares inmunes ha recibido cada vez más reconocimiento. [1]

7.5.1. Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas de bajo peso molecular producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamatoria. Las citocinas actúan como reguladores sistémicos a concentraciones del orden de nanomoles y picomoles, modulando la actividad de un amplio espectro de tipos celulares. Por otro lado, las citocinas pueden actuar como factores de crecimiento, a través de un mecanismo autócrino, paracrino, yuxtacrino o retroquino. En cualquier caso, el efecto biológico de las citocinas se produce a través de su interacción con receptores de membrana específicos que desencadenan una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana que determina su acción biológica. [45, 46]

Las citocinas constituyen una compleja red de interacciones que involucra a diversos linajes celulares. En dicha red, cada una de las citocinas actúa al inducir o suprimir su propia síntesis o la de otras citocinas o sus receptores. Del mismo modo, las citocinas favorecen de manera sinérgica la acción de otras citocinas o bien actúan como antagonistas de sus efectos biológicos y se caracterizan por su efecto

redundante, hecho que subraya la importancia de su función reguladora. Por otro lado, las citocinas se caracterizan por su capacidad de actuar pleiotropicamente sobre diversos tejidos y producir múltiples efectos biológicos de manera simultánea. [46]

De manera análoga, los osteoblastos además de responder a los factores de crecimiento y de diferenciación, también responden a cierto tipo de citocinas que actúan de forma local. Éstas son moléculas que regulan el comportamiento celular del hueso bajo situaciones de inflamación, infección, remodelación y cicatrización, el resultado de estas respuestas celulares puede ser tanto anabólico como catabólico. [39]

El efecto de las citocinas pro-inflamatorias en el hueso depende del momento y el contexto de su expresión. Una citocina puede tener efectos tanto pro-regenerativos como de pro-resorción sobre el hueso. Diversos autores han reportado que la presencia de citocinas inflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 estimula la producción de ALP, OC y aumentan la expresión de CBFA-1, respectivamente. Las citocinas tienen la capacidad de presentar efectos sinérgicos o antagónicos, la exposición simultánea de IL-1 β y TNF- α tiene efectos sinérgicos sobre la deposición de MEC mineralizada de las CTM [39-41]. Estas citocinas ejercen efectos anabólicos al presentarse a dosis bajas en periodos cortos que van de 24 a 96 horas, no obstante, la exposición crónica genera daño resultando en la inhibición de la formación de nódulos de hueso, la disminución de ALP y CLG-1, entre otros efectos.

Por otra parte, citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-10 pueden contrarrestar los efectos pro-inflamatorios de TNF- α , IL-1 β e IL-6, aunque existe información discordante en cuanto a su efecto, se dice que tienen la capacidad de promover la diferenciación osteoblástica, inhibir la osteoclastogénesis a través de la fosforilación de tirosina de una variedad de proteínas de osteoclastos, sin embargo, al igual que las citocinas inflamatorias los niveles altos por tiempo prolongado provocan huesos extremadamente débiles. [41, 42]

8. Objetivos

Objetivo general

Identificar las principales citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IFN- γ y TNF- α) involucradas en la diferenciación *in vitro* de células troncales mesenquimales amnióticas en osteoblastos a partir de su cultivo en la matriz ósea bovina Nukbone[®]

Objetivos particulares

- Obtener y cultivar Células Troncales Mesenquimales a partir de membrana amniótica humana.
- Caracterizar las Células Troncales Mesenquimales de Membrana Amniótica en un sistema *in vitro* a través de ensayo clonogénico, multipotencialidad e inmunotipificación de marcadores de superficie.
- Estimar la proliferación celular de las Células Troncales Mesenquimales de Membrana Amniótica utilizando técnicas espectrofotométricas.
- Estimar la diferenciación osteoblástica de Células Troncales Mesenquimales de Membrana Amniótica a través de su tinción con rojo de alizarina
- Determinar cuantitativamente las citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ TNF- α) durante la diferenciación osteoblástica de Células Troncales Mesenquimales de Membrana Amniótica mediante luminometría.

9. Hipótesis

Siendo Nukbone un potente inductor de la diferenciación osteoblástica promoverá en una primera etapa la producción de citocinas proinflamatorias (IL-2, IL-6, IL-12 (p70), IFN- γ y TNF- α), que disminuirán con el aumento de la secreción de citocinas antiinflamatorias (IL-4, e IL-10) en un sistema *in vitro* de células troncales mesenquimales amnióticas.

10. Materiales y métodos

- Obtención y cultivo de Células Troncales Mesenquimales de Membrana Amniótica

A partir de placentas a término de donadoras sanas se obtuvieron CTM-MA, las mujeres embarazadas que acudieron al servicio del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) fueron evaluadas tomando en cuenta sus condiciones obstétricas, siendo éstas normales, así como resultar negativos los controles serológicos de rutina previos Antígeno de superficie de la Hepatitis B, (HBsAg), virus de hepatitis C (VHC) y virus de inmunodeficiencia humana (VHI). Las mujeres participantes fueron previamente informadas acerca del uso de la MA tomada de la placenta para nuestros fines y firmaron la carta de consentimiento informado. Posteriormente bajo condiciones de esterilidad se tomó toda la placenta seleccionando un fragmento de 5 cm² de diámetro alrededor del cordón umbilical, separando mecánicamente la MA del corion, seguida de lavados con PBS y PPLO al 1% para ser sometida a digestión enzimática con colagenasa tipo II y tripsina de acuerdo con Rodríguez, N. y colaboradores [5]. Las células obtenidas fueron cultivadas bajo condiciones estándar de cultivo celular, con medio de cultivo de Eagle modificado por Dubecco con alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (H-DMEM) y 1% de antibiótico-antimicótico.

Se tomaron algunos cortes de MA antes del tratamiento enzimático y durante el proceso de digestión, estos cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina con la finalidad de evaluar el proceso de obtención de las CTM-AM.

Para seleccionar las CTM-MA se removieron las células no adherentes mediante el cambio a las 72 h de cultivo, mientras que las adherentes fueron cultivadas hasta alcanzar el 90% de confluencia y recuperadas por tripsinización. El medio de cultivo se renovó cada tercer día.

- Caracterización de Células Troncales Mesenquimales de Membrana Amniótica
 - Ensayo clonogénico

Para evaluar las propiedades de autorrenovación, las CTM-MA, fueron cultivadas en H-DMEM a diferentes concentraciones celulares por triplicado: a) 0 células, b) 25 células, c) 50 células, d) 100 células y e) 200 células. Los cultivos de todos los grupos fueron mantenidos por 7 días sin cambio de medio. Transcurrido este tiempo las células se fijaron con metanol para posteriormente teñirse con May-Grünwald Giemsa al 0.5%. Finalmente, se contaron los puntos violetas, los cuales fueron considerados como colonias.

- Potencial osteogénico

La diferenciación de las CTM-MA en osteoblastos se realizó con células en el tercer pase de cultivo. La diferenciación osteogénica se desarrolló cultivando las células a confluencia en medio H-DMEM suplementado con β -GP (0.005%), dexametasona (0.392%) y ácido ascórbico (0.2166%). Tras 14 días de cultivo, las células se tiñeron con Rojo Alizarina.

- Inmunotipificación

Las CTM en el primer pase de cultivo celular, se recuperaron por tripsinización en PBS, hasta obtener una suspensión celular de 1 millón células/mL. Se determinó la expresión de las proteínas de superficie CD105, CD73, CD90 y CD44 mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos para cada antígeno (Tabla 3) y como control negativo se emplearon las CTM sin ningún marcaje, se emplearon dos grupos experimentales, tanto éstos como el grupo control negativo fueron analizados por triplicado. Los datos para la determinación de la expresión de proteínas relacionadas con el inmunofenotipo fueron analizados en el citómetro de flujo Facscalibur de B & D y los resultados fueron analizados con el software Cell quest pro.

Tabla 3. Marcadores utilizados en citometría de flujo de las Células Troncales Mesenquimales

Nombre	Fluorocromo	No. Catálogo (BD Pharmingen)
CD105	PE Cy5	560839
CD90	FICT	555595
CD73	PE	550.257
CD44	PE Cy7	555 479

- Determinación de la proliferación celular

La proliferación celular se estimó por el método espectrofotométrico que emplea como reactivo el colorante Alamar Blue® (resazurina) en CTM-MA cultivadas en medio H-DMEM, de acuerdo con el inserto del fabricante [46]. La cuantificación de la proliferación por este método se basa en el cambio colorimétrico que sufre la resazurina en respuesta a la reducción metabólica celular reflejada por la intensidad de la fluorescencia producida. Este recambio se midió en un lector de placas EPOCH™ a una longitud de onda de 570 nm con referencia a 610 nm, utilizando el software Gen5™. Se realizó una curva de calibración con concentraciones desde 0 células a 18 000 células/pozo. De manera similar, se sembraron 6 000 células por pozo con NKB y sin NKB, ambas condiciones por triplicado.

- Determinación de citocinas secretadas en la diferenciación osteoblástica

Se sembraron CTM-MA en microplacas de 12 pozos a una densidad de 38 000 células por pozo, en dos condiciones de cultivo por triplicado: 1) Control negativo (-NKB), CTM-MA cultivadas directamente sobre la microplaca con H-DMEM; 2) Experimental (+NKB), CTM-MA cultivadas sobre discos de NKB con H-DMEM. Las CTM-MA fueron mantenidas en cultivo por 14 días recuperando los sobrenadantes (1 mL) en los días 0, 3, 7 y 14 de cultivo. Se cuantificaron las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α utilizando el kit Bio-Plex® Precision Pro™ Human Cytokine Panel 10-Plex (Cat. #171-A1001P, Lote/Control: 64017527, USA). Las muestras fueron tratadas de acuerdo al inserto del proveedor. Para cuantificar las

citocinas se utilizó el equipo Bio-Plex™ 200 System (Bio-Rad) y el software Bio-Plex Manager 6.1 (Bio-Rad). Se emplearon 5 muestras por duplicado.

- Análisis estadístico

Utilizando el software GraphPad Prism 6 se calcularon las medias y las desviaciones estándar para las pruebas de clonogenicidad, inmunotipificación y proliferación de las CTM-MA, así como para la cuantificación de las citocinas en los dos grupos de estudio. De manera conjunta, se realizó un análisis con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney comparando el control negativo (-NKB) y el experimental (+NKB) con la finalidad de establecer si existe una posible diferencia en la producción de las citocinas entre las CTM-MA cultivadas en NKB y sin NKB.

11. Resultados

- Obtención y cultivo de Células Troncales Mesenquimales de Membrana Amniótica

Se tomaron muestras de tejido de MA posterior al tratamiento con tripsina/EDTA 0.05% y con colagenasa tipo II, con la finalidad de verificar la ausencia de células y la degradación de la MEC. Como lo muestra la figura 7, con el procedimiento seguido en este trabajo se logró el aislamiento celular de manera efectiva (Fig 7-C).

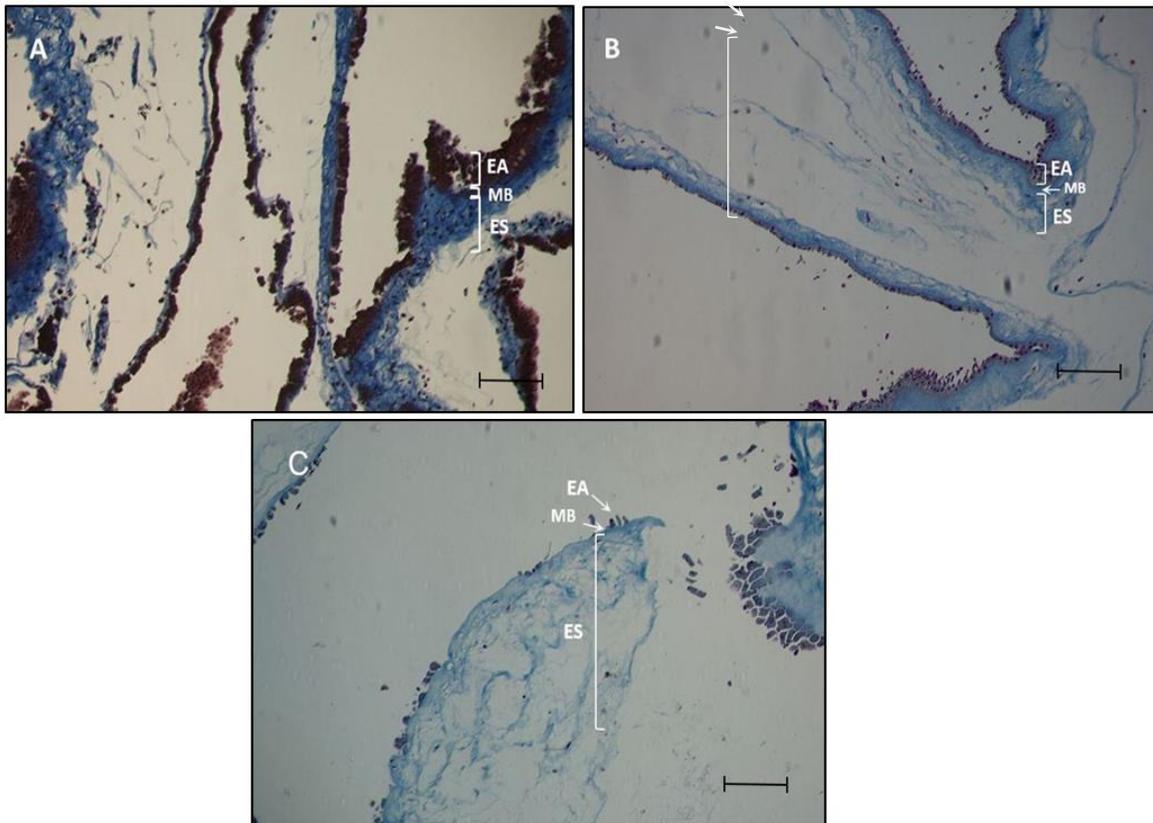


Figura 7. Histología de membrana amniótica humana. Corte de membrana amniótica teñida con hematoxilina-eosina. Objetivo: 20x EA: epitelio amniótico, MB: membrana basal, y ES: estroma. A) Pre-tripsina/colagenasa B) Post-tripsina 0.05% C) Post-tripsina/colagenasa 0.05%/0.1

Las CTM-MA obtenidas por digestión enzimática, mostraron adherencia al plástico y formación de una monocapa celular, en todas las muestras se observó una población de células no adherentes suspendidas en el medio de cultivo al momento de realizar el primer cambio de medio. Mediante microscopía de contraste de fases se observaron células individuales con morfología redondeada (Fig 8-A), este tipo de morfología fue cambiando conforme transcurrió el tiempo de cultivo hacia una conformación fibroblastoide presentando un núcleo redondo, citoplasma ligeramente basófilo y en ocasiones granular, se lograron distinguir las proyecciones del citoesqueleto que les proporciona la diversa morfología celular, (Fig. 9).

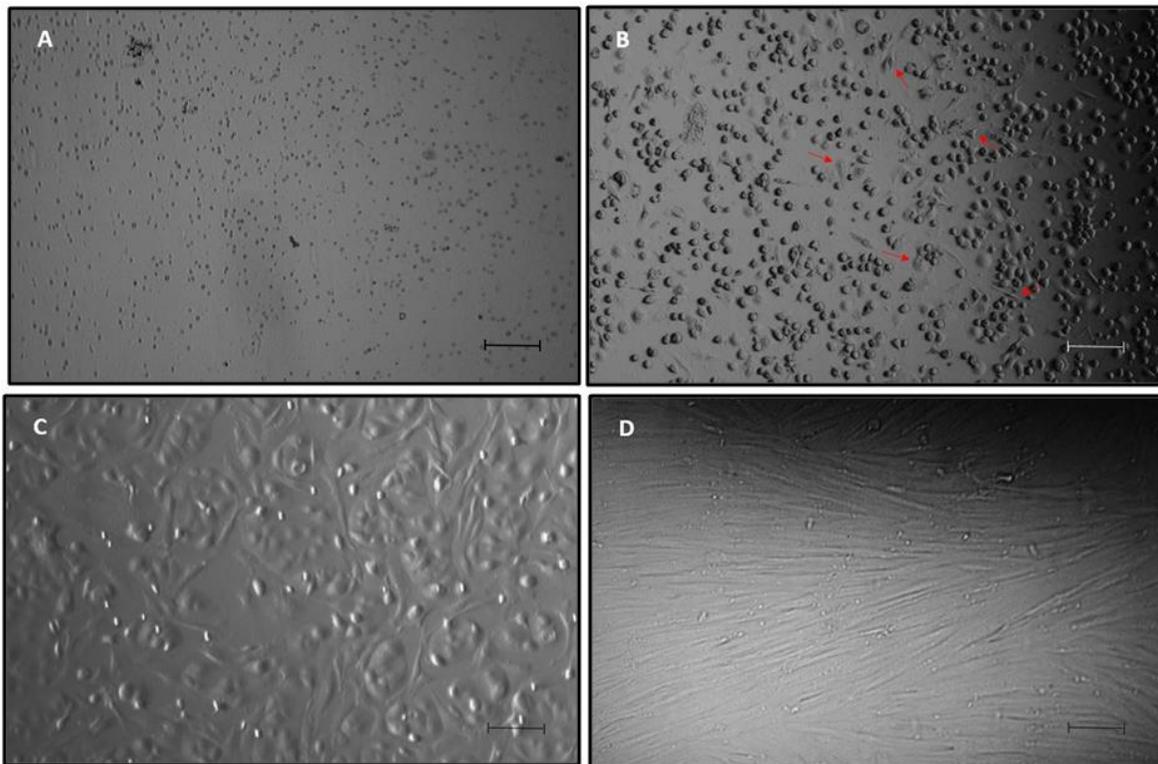


Figura 8. Células Troncales Mesenquimales..A) Cultivo primario de CTM-MAa 10x; B) CTM-MA adheridas (flechas rojas) a dos días de cultivo a 20x; C) CTM-MA con claras prolongaciones citoplasmáticas a 20x y D) Confluencia mayor a 90% de cultivo de CTM-MA a 20x.Las observaciones se realizaron en contraste de fases. Barra de escala= 100 μ m.

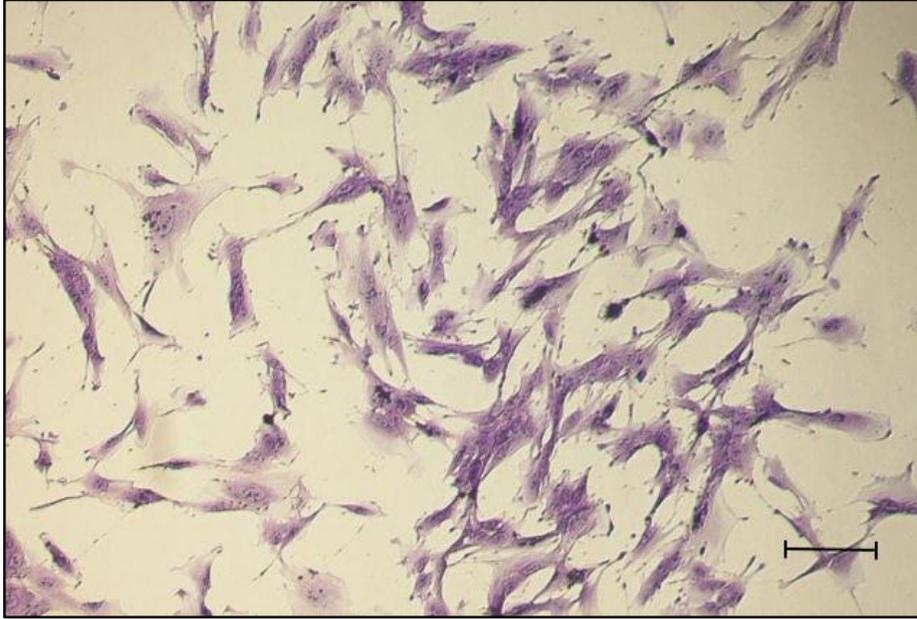


Figura 9. Células Troncales Mesenquimales teñidas con May-Grünwald Giemsa. La imagen muestra las células en cultivo durante 7 días, se puede apreciar la morfología fibroblastoide característica de esta estirpe celular. Objetivo 20x, iluminación campo claro. Barra escala = 50 μ m.

- Caracterización de Células Troncales Mesenquimales de Membrana Amniótica
 - Clonogenicidad

La capacidad clonogénica de las CTM-MA se comprobó a través de su cultivo durante 7 días a diferentes densidades celulares (0, 25, 50, 100 y 200 células) cultivadas en H-DMEM. En los cultivos sembrados con 0 células (control negativo) no se observó crecimiento celular (resultados no mostrados), mientras que en los ensayos restantes la coloración con May-Grünwald Giemsa evidenció la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC), (Fig. 10).

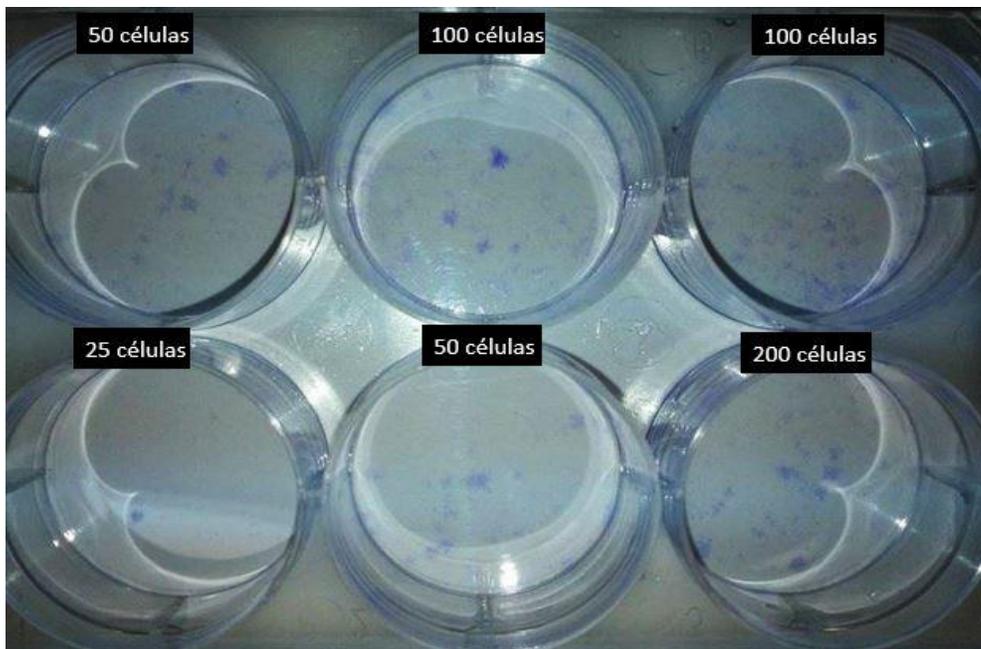


Figura 10. Ensayo de clonogenicidad celular. Vista macroscópica de las Unidades Formadoras de Colonias formadas por las células troncales mesenquimales humanas derivadas de membrana amniótica. La Imagen muestra las UFCs a diferentes densidades celulares teñidas con May-Grünwald Giemsa a siete días de cultivo.

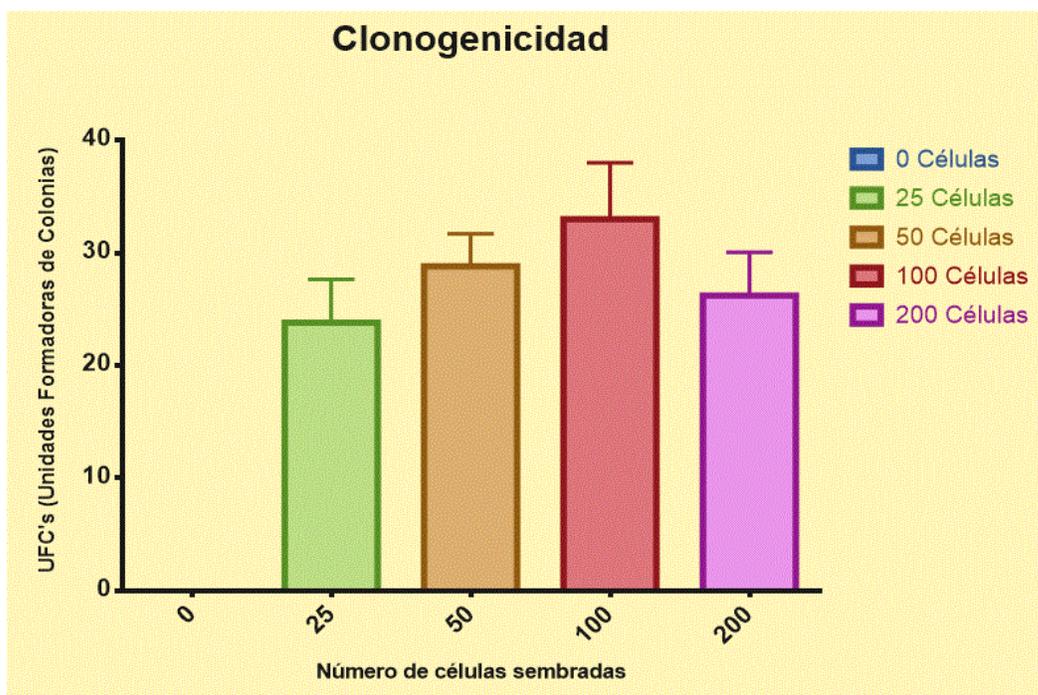


Gráfico 1. Clonogenicidad celular. Número de colonias observadas a diferentes densidades celulares de células troncales mesenquimales humanas derivadas de membrana amniótica después de siete días de cultivo. El gráfico muestra el promedio de tres repeticiones experimentales \pm desviación estándar.

- Potencial osteogénico

Tras cultivar las CTM-MA en medio de estimulación osteogénica y teñirlas con rojo de alizarina. Como lo muestra la figura 11, los cultivos celulares cultivados con medio osteogénico se aprecia la formación de precipitados rojizos, que corresponden a depósitos de calcio característicos de la actividad osteoblástica. En contraste, los cultivos celulares cultivados en medio control H.DMEM no presentaron depósitos de calcio. Este hallazgo demuestra que las CTM-AM poseen capacidad osteogénica.

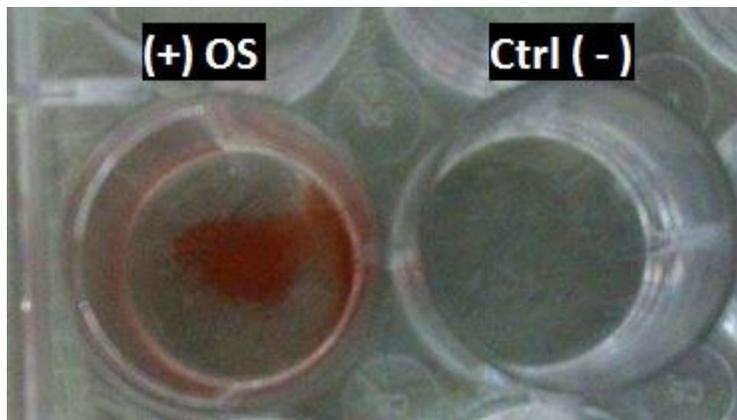


Figura 11. Potencial osteogénico. Cultivos celulares de células troncales mesenquimales humanas derivadas de membrana amniótica estimuladas con medio osteogénico durante 14 días. La imagen muestra la presencia de depósitos de calcio evidenciados mediante tinción

- Inmunotipificación

Como control negativo de la inmunotipificación se emplearon CTM sin ningún marcaje y se les determinó la presencia de los marcadores (CD44, CD73, CD90 y CD105) por triplicado, los Dot Plot resultantes no mostraron fluorescencia (resultados no mostrados).

En el grupo experimental también se determinó el tamaño celular (Forward Scatter, FS) vs complejidad interna (Side Scatter, SSC) tomando como ventana de estudio a R1 (Gráfico 2-A) que se marcaron con inmunoglobulinas específicas para los CD's de estudio y se determinaron por triplicado. El gráfico 2-B muestra en el cuadrante R3 las células doblemente positivas para CD73 y CD90, y sobre las cuales se determinó la presencia de CD44 y CD105 (Gráfico 2-C) en el cuadrante R7 se muestran las células positivas a los cuatro marcadores estudiados. Mientras que los gráficos 2-D y 2-E reafirman la presencia de CD105, CD90 y CD44 ya que a partir de R7 (gráfico 2-C) se obtuvo el gráfico 2-D y a partir de R11 (gráfico 2-D) se obtuvo el gráfico 2-E.

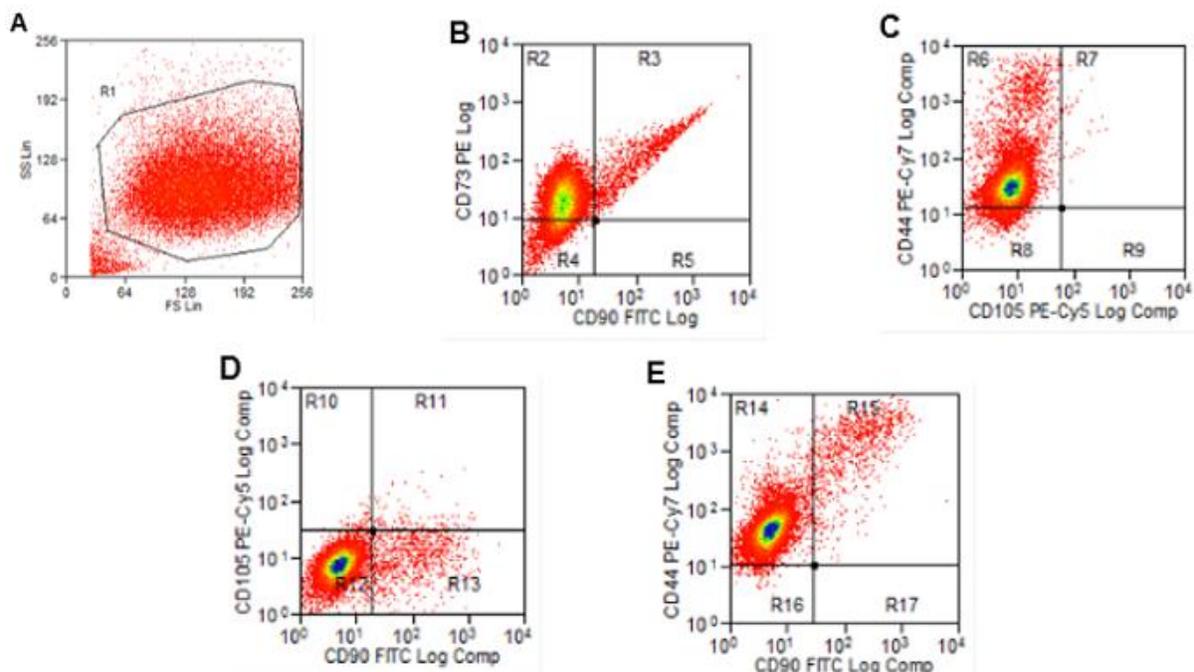


Gráfico 2. Inmunofenotipo mediante citometría de flujo. CTM-AM en el primer pase de cultivo representado por gráficos tipo Dot Plot. A) Determinación del tamaño celular (FS) vs la granularidad celular (SS), se toma R1 con 27, 735 células como ventana de estudio. B) Expresión de CD90 (FITC) vs CD73 (PE) en CTM-MA, se toma R3 como ventana de estudio. C) Expresión de CD105 (PE-Cy5) vs CD44 (PE-Cy7) se toma R7 como ventana de estudio. D) Expresión de CD90 (FITC) vs CD105 (PE-Cy5), se toma R11 como ventana de estudio. E) Expresión de CD90 (FITC) vs CD44 (PE-Cy7).

Dichos marcadores corresponden a los característicos de las células mesenquimales, del mismo modo fueron negativas a los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 (datos no mostrados).

Este hallazgo demostró que las CTM-MA empleadas en el estudio fueron principalmente mesenquimales. Ya que la mayoría de la población analizada fue positiva para uno, dos o tres marcadores mesenquimales de acuerdo a la ISCT. Este resultado es congruente con estudios previos realizados con esta población celular en los ensayos de determinación del potencial osteoinductor de NKB [5] así como con estudios en los que se develo la presencia de al menos dos subpoblaciones celulares dentro de este tipo de muestra [47].

- Proliferación celular

La capacidad proliferativa de las CTM-MA se evaluó por el método de Alamar Blue® (resazurina) en placas de 96 pozos y lecturas diarias durante 7 días. El vire de color del reactivo azul hacia el rojo indica una mayor actividad proliferativa, dado que el metabolismo celular cataliza el cambio de color como se muestra en la figura 12.

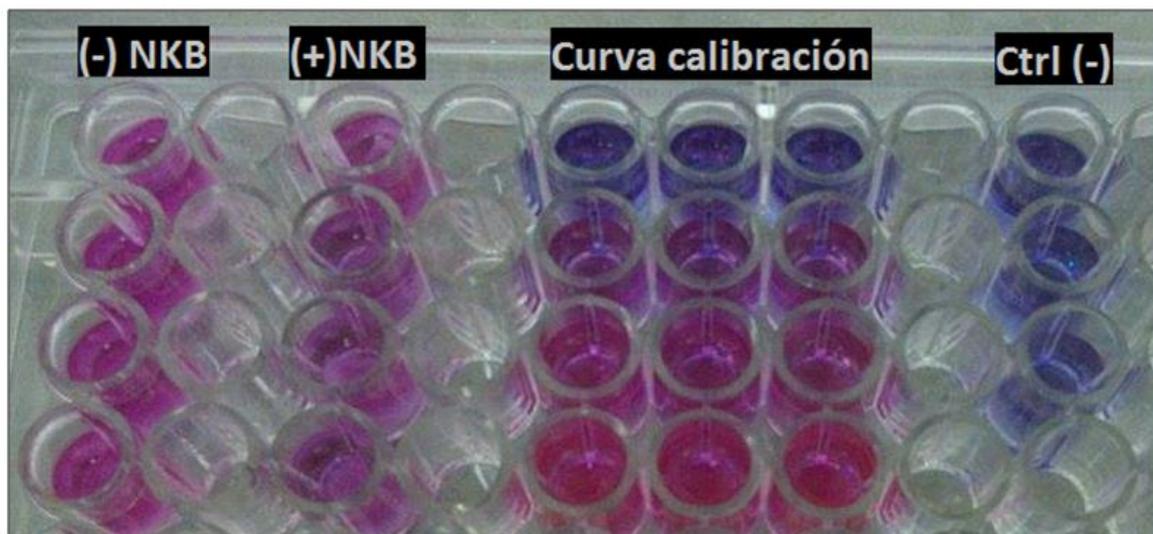


Figura 12. Evaluación de la proliferación celular. La imagen muestra la una placa representativa donde se sembraron los diferentes grupos para evaluar la proliferación en presencia y ausencia del biomaterial.

Los cultivos celulares del control positivo (-NKB), así como en los cultivos experimentales (+NKB) mostraron una cinética de proliferación semejante, la cual incremento de manera exponencial conforme transcurrió el tiempo del experimento. La proliferación celular en el control positivo, fue estadísticamente mayor a la proliferación celular observada en los cultivos con NKB, para tal determinación se analizó la constante de proliferación de cada curva de crecimiento (Gráfico 3). Este efecto probablemente se deba a que el NKB es un disco tridimensional por lo que el área de cultivo es mayor lo cual impacta en la velocidad del proceso de proliferación celular, este hecho concuerda con lo reportado previamente por Rodríguez y cols. [5]. Los controles negativos (medio de cultivo y Nukbone y solamente medio de cultivo) no mostrarán proliferación celular (HG-DMEM).

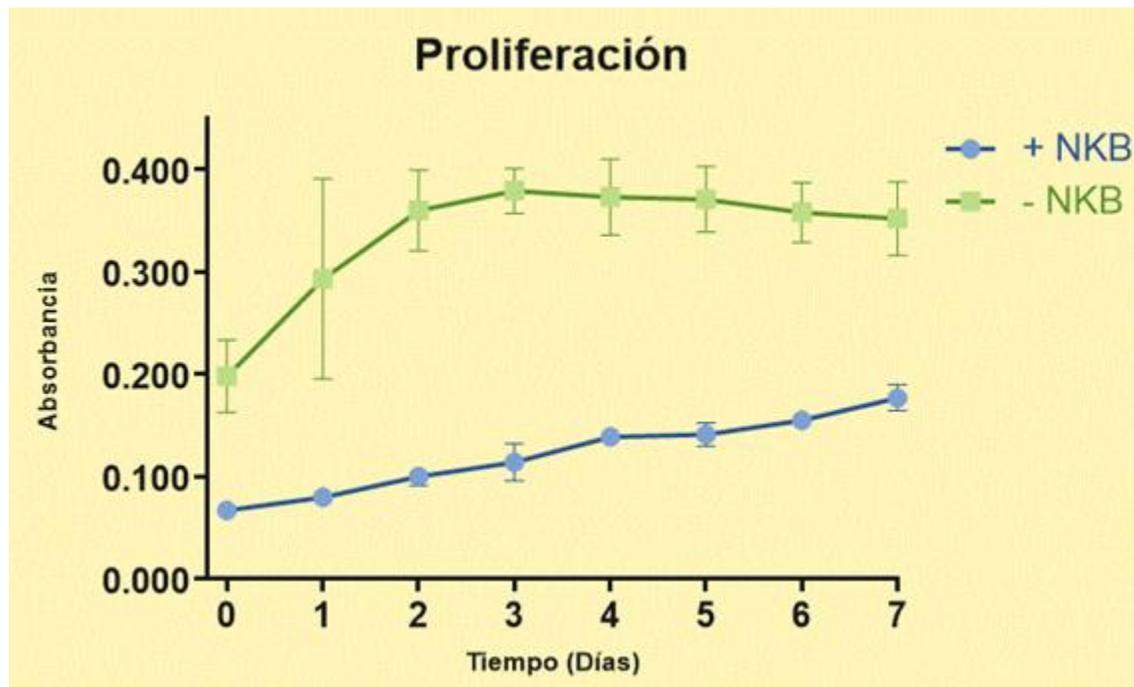


Gráfico 3. Proliferación celular en presencia de Nukbone. CTM-MA cultivadas sobre NKB y sin NKB. La proliferación celular se evaluó a través de la reducción de la resazurina. El gráfico muestra el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. $P < 0.005$

- Perfil de citocinas

Como se mencionó anteriormente, se manejaron dos grupos de estudio (-NKB y + NKB) en los cuales se cuantificaron las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12(p70), TNF- α e IFN- β , los datos obtenidos se muestran en los siguientes gráficos.

El Gráfico 4 correspondiente a citocinas proinflamatorias permite observar la secreción de este tipo de citocinas en presencia de NKB. La presencia de NKB promueve una disminución significativa de IL-2 al día 3 de cultivo en comparación con el cultivo en ausencia de NKB, además de esto, es posible apreciar que al día 14 de cultivo se incrementa la secreción de IL-2 en los cultivos con NKB en comparación con los cultivos sin el biomaterial (Gráfico 4-a). De manera conjunta el perfil secretorio de IL-12 (p70), IFN- γ , y TNF- α mostraron un comportamiento semejante en los cultivos con y sin NKB (Gráfico 4 b,c,d).

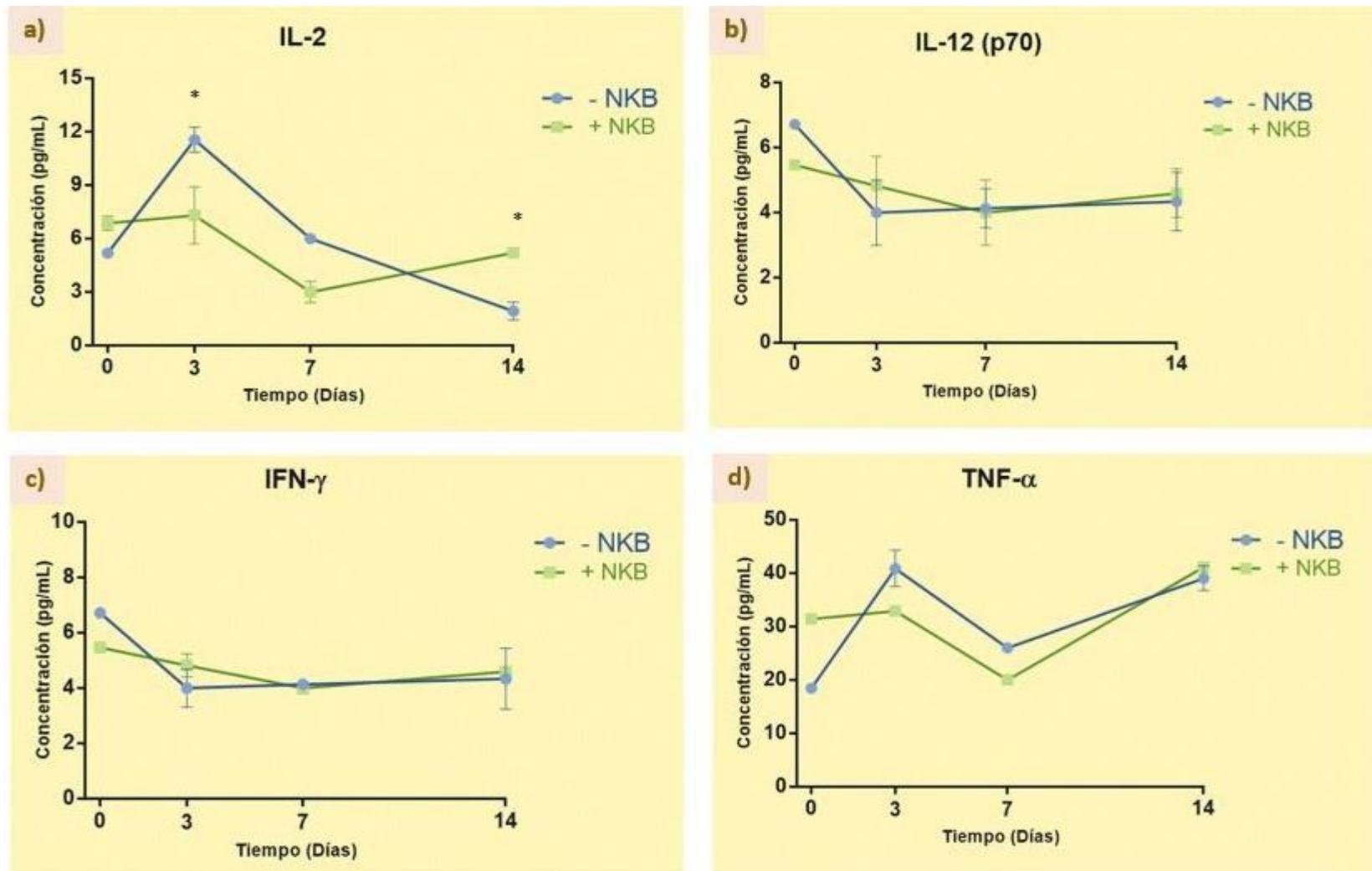


Gráfico 4. Cuantificación de citocinas proinflamatorias por luminometría. Las determinaciones fueron realizadas en sobrenadantes de CTM cultivadas en NKB y sin NKB en los días 0, 3, 7 y 14. Promedio de cinco determinaciones \pm desviación estándar. a) IL-2, b) IL-12 (p70), c) IFN- γ y d) TNF- α .

Por otro lado, respecto a las citocinas antiinflamatorias analizadas, se observaron algunos cambios significativos. La citocina IL-4 mostró un incremento del 104.65 % (0.9 pg/mL) a partir del día siete de cultivo, en comparación con el control negativo (-NKB) (Gráfico 5-a) , es en el día 14 donde se observa una diferencia significativa de concentración entre ambos grupos .

En contraste con este comportamiento, la citocina IL-10 mostró un comportamiento semejante en las condiciones con y sin NKB. (Gráficos 5-b), s

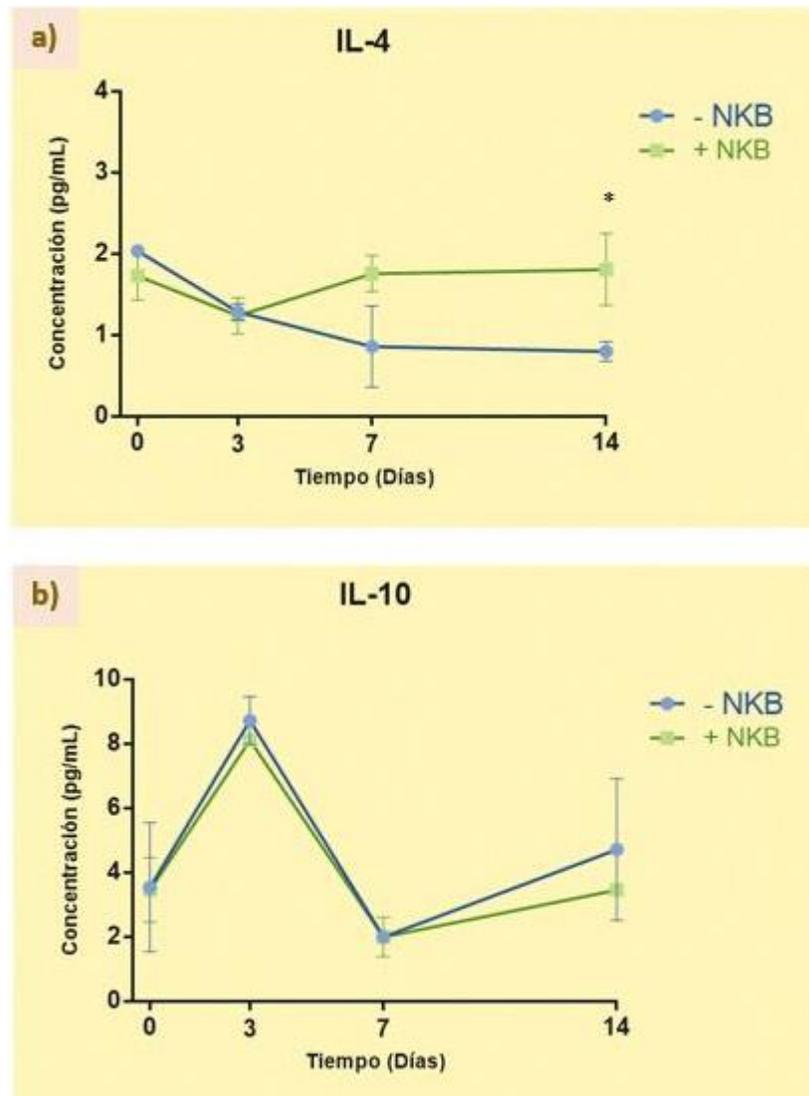


Gráfico 5. Cuantificación de citocinas antiinflamatorias por luminometría. Las determinaciones se realizaron en sobrenadantes de CTM cultivadas en NKB y sin NKB en los días 0, 3, 7 y 14.

Promedio de cinco determinaciones \pm desviación estándar. a) IL-4 y b) IL-10.

*Diferencia significativa

Finalmente, la citocina pleiotrópica IL-6 mostró una baja concentración al día 3 de cultivo (T3) con NKB en comparación del cultivo sin NKB. Después del día 3, IL-6 disminuye en ambas condiciones experimentales (+ NKB y – NKB) y se mantiene la secreción hasta el día 14 de cultivo.(Gráfico 6). Cabe mencionar que en el día 3 esta citocina fue la única que presentó diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de estudio.

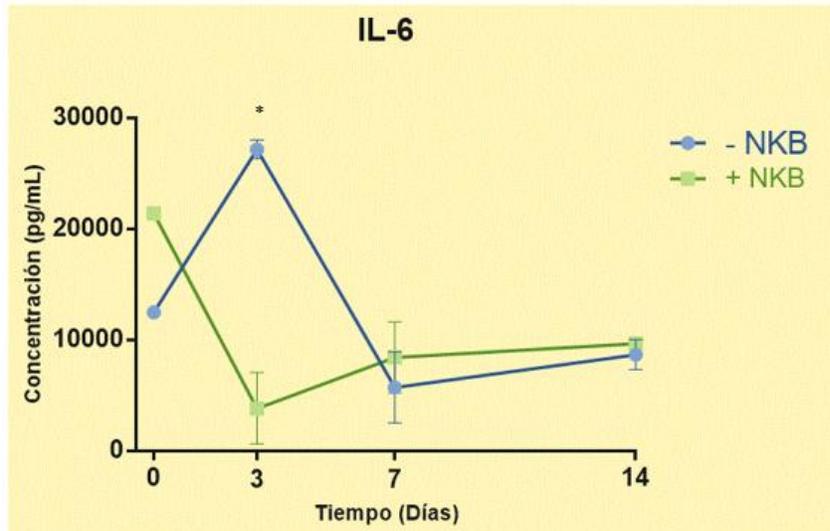


Gráfico 6. Cuantificación de la IL-6 por luminometría. Las determinaciones se realizaron en sobrenadantes de células cultivadas en NKB y sin NKB en los días 0, 3, 7 y 14. Promedio de cinco determinaciones con desviación estándar.

12. Discusión

La médula ósea se ha considerado como la principal fuente de aislamiento de CTM, sin embargo, sólo 0.003% de las células mononucleares obtenidas de esta fuente son troncales mesenquimales. Aunado a lo anterior desde el año 2006, se conoce que existen algunos aspectos que dificultan su uso, como son: la limitada tasa de crecimiento, la capacidad de diferenciación de acuerdo con la edad del donante de MO y el riesgo de la toma de muestra [48]. Por lo que en el presente estudio dirigimos nuestra atención hacia la MA, como una fuente alternativa de CTM que ha estado en el escenario científico desde principios de la década pasada, una fuente fácilmente accesible, éticamente aceptable y con un alto rendimiento en la obtención de CT según publicaciones recientes [29], las cuales concuerdan con los resultados obtenidos en la primera fase de este estudio, en la cual se demostró la eficiencia de la obtención celular (Fig. 7, 8 y 9), así como el hecho de que las células obtenidas son principalmente mesenquimales, lo cual fue demostrado mediante los estudios de inmunofenotipo (Gráfico 2).

En la primera etapa se realizó la caracterización de las CTM, para su extracción se sometió la MA a digestión enzimática con tripsina/colagenasa enzimas que rompen uniones intercelulares liberando de este modo las células de los tejidos. Las células amnióticas están fuertemente adheridas a la membrana basal, y conectadas entre sí mediante desmosomas [51]. La tripsina es una proteasa inespecífica por lo cual las incubaciones tuvieron una duración limitada para evitar daños irreversibles a las células [52]. Debajo de éstas se encuentra la capa compacta rica en CLG que junto con otras proteínas favorece la adhesión de las células epiteliales; al ser la colagenasa II una proteasa específica que hidroliza la CLG [52] permitió degradación de la MEC, promoviendo la liberación celular, que se muestra a través de cortes histológicos en la Figura 7. Como se esperaba, durante el aislamiento celular, no se obtuvo solo una población celular debido a la composición inherente de la MA, la cual se constituye principalmente por células mesenquimales situadas en la capa estromal, además de células mesenquimales fibroblastos-like o CTM y escasos macrófagos [51]. En el cultivo primario de las células obtenidas a partir de

la MA, se distinguieron diversos tipos celulares; las células no adherentes suspendidas en el medio de cultivo correspondían a células hematopoyéticas así como detritos celulares, este tipo de células fueron removidas con los cambios rutinarios de medio de cultivo (Fig. 8-A). En contraste, conforme transcurrió el tiempo de cultivo, las CTM evidenciaron prolongaciones citoplasmáticas que les permitieron adherirse a la caja de cultivo (Fig. 8-B); posteriormente presentaron una morfología espigada, en forma de huso con la presencia de un núcleo alargado (Fig. 8-C y Fig. 9) características de estas células [54].

La capacidad multipotencial de las CTM se demostró por primera vez, en un modelo *in vivo* con los trabajos de Fiedsenstein y cols., en los años 1970's [54]. Desde ese entonces, el determinar el potencial de diferenciación de las células troncales mesenquimales obtenidas ha sido un parámetro de control y verificación de obtención de esta estirpe celular. En este sentido, para confirmar que las células obtenidas en este trabajo preservaran su capacidad multipotente se realizó el ensayo de diferenciación de las CTM-MA hacia células osteogénicas utilizando medio de diferenciación osteogénico. Este proceso de diferenciación se evidenció por la acumulación de depósitos de calcio a través de la tinción con rojo de alizarina. Las CTM-MA mostraron positividad para la tinción confirmando la presencia de actividad osteoblástica mientras que las células cultivadas en medio estándar (sin inductores osteogénicos) no resultó positiva a la tinción con rojo de alizarina (Fig. 11). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sanjurjo quien utilizó un medio osteogénico comercial para inducir la diferenciación osteoblástica [57].

Posteriormente se determinó el inmunofenotipo de las células a través de CMF, como control negativo se emplearon células sin marcaje que no presentaron autofluorescencia que pudiera interferir con la emisión de luz de los fluorocromos utilizados (resultados no mostrados) y para el grupo experimental se seleccionó la región de estudio (R1) que contenía a las células de mayor tamaño y con alta granularidad (Gráfico 2-A) de acuerdo a reportes previos sobre esta estirpe y fuente celular [5, 47, 63].

El Gráfico 2-B (R3) muestra que una parte de la población es doblemente positiva a los marcadores CD73 y CD90, posteriormente en el gráfico 2-C (R7) se evidenció que esta misma población presentaba los marcadores CD105 y CD44. Con la presencia de estos marcadores se demostró que las células correspondían a CTM ya que de acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society Cellular Therapy) que dicta que las células que sean consideradas como CTM deben expresar uno, dos o tres de los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34 y CD45 (resultados no mostrados). El porcentaje de la presencia de los marcadores en las CTM fue diverso y depende del estadio celular. Reportes previos publicados por Leyva-Leyva y cols. [47] y Rodríguez y cols. [5], mostraron resultados similares a los reportados en este trabajo.

Adicional a lo propuesto por la ISCT también se tomó en cuenta el fenómeno de auto-renovación, esto es la capacidad que tiene una célula troncal de dividirse y dar origen a clones lo que se conoce como Unidades Formadoras de Colonias o UFCs [24] (Fig. 10). En este estudio, se logró comprobar que las células obtenidas presentaron capacidad clonogénica, lo cual pudo ser determinado por el conteo directo de las UFC's presentes en cada cultivo celular a diferentes densidades celulares. De esta determinación, fue posible estimar la relación directa entre el número de células y la formación de UFCs, encontrando un mayor número de éstas conforme aumentaban las células sembradas a excepción del último grupo correspondiente a 200 células, la cual corresponde al número de células crítico para inhibir la formación de UFCs (Gráfico 1). De acuerdo con algunos investigadores, cuando las células se siembran a baja densidad se acelera el proceso de senescencia, probablemente debido a que la proliferación celular depende de mecanismos moleculares complejos que involucran a las integrinas y a la interacción célula-célula [29]. En otras palabras el contacto entre células favorece su autorrenovación, no obstante cuando el número de células es alto puede presentarse la inhibición por contacto, una célula cesa la división celular cuando entra en contacto con otras células. [29]. Sin embargo, respecto a la prueba de Clonogenicidad, con una baja densidad celular una célula troncal aislada puede dar

origen a una colonia celular, en cambio al incrementar la densidad celular, las células establecen interacciones mediante señalizaciones químicas que les hacen proliferar y establecer contacto entre ellas (célula-célula) por lo que la presencia de colonias es escasa dado que al incrementar el número de células se forma una monocapa celular[29].

Otro aspecto evaluado durante este trabajo fue la estimación de la proliferación de las CTM-MA cultivadas en presencia de NKB y sin NKB. Esto se realizó con el objeto de determinar si el NKB es un biomaterial capaz de promover la proliferación de las células presentes en su rededor, dado que para que un biomaterial se considere idóneo para ingeniería tisular debe ser poroso, permitir la proliferación celular, ser degradable y permitir una nueva formación de tejido [55]. Investigaciones recientes, han reportado que la topografía de NKB ofrece un ambiente adecuado para la adhesión celular así como una influencia positiva para la proliferación *in vitro* de CTM-MA [5]. De manera semejante, los resultados hallados respecto a la proliferación celular, demuestran que NKB permite la proliferación celular de una manera semejante a la del control positivo (CTM + medio osteogénico, resultados no mostrados), sin embargo, la mayor proliferación se observó en cultivos carentes del biomaterial, lo cual puede atribuirse a las dimensiones del material, dado que NKB es un material poroso, interconectado y tridimensional, mientras que la placa de plástico es lisa y muestra una sola dimensión, en este sentido, el período de adaptación de las células al material es más lento debido a que la estructura de este material ofrece un reto mayor para la célula en comparación con una placa de cultivo en el cual las células pueden establecer interacciones entre sí a un menor tiempo en comparación con los cultivos con NKB, (Gráfico 3). Este evento, ha sido reportado para otros biomateriales [4].

La capacidad osteoinductiva de NKB se ha demostrado a través de estudios genómicos relacionados con la expresión de genes clave del proceso osteoinductivo como el CBFA-1 y la OC sin necesidad de inductores externos. Probablemente, las interacciones célula-NKB promuevan cambios en la expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la osteogénesis [5]. Sin embargo, el

mecanismo de acción que promueve que NKB active la expresión de estos genes clave de la diferenciación osteoblástica aún no ha sido develada.

Existen diferentes hipótesis acerca de esta activación, una de ellas, plantea que la interacción celular que se establece con el material, induce que las células secreten citocinas proinflamatorias que auto-regulen y promuevan su diferenciación hacia el linaje osteoblástico. En este sentido, existen diversos estudios que se centran en la relación que existe entre la diferenciación osteoblástica y la inflamación, estudios previos han investigado los efectos de las citocinas en las poblaciones mesenquimales para determinar la influencia que una reacción inflamatoria podría tener sobre la biología de esta estirpe celular.

Numerosos autores coinciden con que algunos mediadores inflamatorios estimulan la resorción ósea e inhiben la formación del hueso, por ejemplo la IL-1 y el TNF- α han mostrado regular negativamente la producción de la CLG I y OC en modelos tanto *in vivo* como en modelos *in vitro*, aunque se desconoce el mecanismo de esta inhibición [56,57]. Por el contrario, diversos trabajos demuestran que un ambiente inflamatorio tiene una importancia potencial ya que éste es necesario para iniciar la reparación o regeneración del tejido cuando se genera daño significativo en el mismo [56].

Del mismo modo, el TNF- α y la IL-6 comparten una conducta de aparición durante la regeneración ósea, puesto que ejercen efectos anabólicos al presentarse a dosis bajas en periodos cortos que van de 24 a 96 horas, [37-39] un comportamiento similar al que presentaron estas citocinas junto con otras también de carácter proinflamatorio como IL-2 durante su determinación en sobrenadantes de las CTM-MA cultivadas en NKB, donde se muestra una menor secreción de esta citocina en presencia de NKB, en comparación con la secretada por las células cultivadas sin el biomaterial en los tiempos T3 y T7 (Gráfico 4-a y 4-c). Este efecto puede deberse a que esta citocina se relaciona con la supervivencia y estimulación de la proliferación celular, proceso que tiene lugar en la primera etapa de cultivo que va de los 0 a 7 días de cultivo. De manera consistente con este resultado, la proliferación celular disminuye a partir del día 3 del proceso de diferenciación

osteoblástica para dar paso a la etapa de biosíntesis de MEC [64]. Un hallazgo importante es que la secreción de IL-2 es menor en presencia que en ausencia de NKB a los días 3 y 7 de cultivo y presenta un incremento al día 14 de cultivo celular, lo que probablemente refleje una compleja red de regulación mediada por NKB, en la que se requiere de “picos” de secreción de ciertos factores, como IL-2, para promover y mantener el proceso de diferenciación osteoblástica, como ha sido reportada para la expresión de OC y CBFA-1, los cuales presentan “picos” de expresión durante el proceso de diferenciación osteoblástica [5]. En contraste, la IL-12 (p70) (Gráfico 4-b) citocina proinflamatoria cuya relación hasta ahora conocida con la formación ósea es inhibir la osteoclastogénesis [59] mostró un comportamiento semejante en las dos condiciones experimentales (+ NKB y – NKB) durante el tiempo de estudio. Por otro lado, también de índole proinflamatorio TNF- α y el IFN- γ , muestran un comportamiento secretorio semejante en presencia y en ausencia de NKB, sin cambios significativos durante el proceso de diferenciación osteoblástica. En el proceso de diferenciación osteoblástica se ha demostrado que TNF- α estimula la producción de OC, la cual exhibe su máxima expresión al día 30 de cultivo celular, manteniéndose a baja expresión en las primeras etapas de la diferenciación osteoblástica, por lo que la baja expresión de estas citocinas proinflamatorias puede deberse a que los tiempos de análisis que se presentan en este trabajo, representan las etapas de activación de la diferenciación osteoblástica y no el mantenimiento de este proceso.

Aunado a este hallazgo, TNF- α aumenta en presencia y ausencia de NKB al día tres de cultivo y baja hacia el día siete, manteniéndose sin cambio significativo hacia el día 14 (Gráfico 4-d). Este efecto puede deberse a la pérdida ósea que ejerce esta citocina, lo cual ha sido demostrada en el transcurso de la resorción ósea en enfermedades periodontales [65]. En este sentido el hecho de que TNF- α disminuya después del día 3, puede deberse a que las CTMs a este tiempo de estudio se encuentran comprometidas con el fenotipo osteoblástico, lo cual detonará la formación ósea disminuyendo la resorción de hueso. Esta hipótesis toma fuerza al considerar estudios previos en los que se ha demostrado que TNF- α inhibe la producción de CLG I, lo cual podría estar relacionado con el desarrollo del fenotipo

osteoblástico [30] debido a que la producción de CLG durante la diferenciación osteoblástica, disminuye a partir del día 3 de cultivo celular dando paso a la etapa de mineralización de la MEC.

Por otro lado, el IFN- γ en las células de ambos grupos experimentales, muestra una tendencia a disminuir hasta el T7, este evento puede deberse a la acción inhibitoria de la formación de osteoclastos que exhibe esta citocina. En trabajos previos, se ha demostrado que la inhibición de la osteoclastogénesis mediada por IFN- γ se inicia cuando la diferenciación osteoblástica se ha establecido, a la vez que estimula la síntesis de diversas citocinas como IL-18 [59].

Por otro lado, como parte de las citocinas de carácter principalmente antiinflamatorio se encuentra la IL-4 e IL-10, éstas pueden regular de manera negativa (a la baja) la síntesis de las citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , así como la secreción de colagenasa, por lo que han sido consideradas como reguladores de la homeostasis del hueso [60], además de esta función, estas citocinas tienen la capacidad de inhibir la maduración osteoclástica [59].

En los ensayos con NKB, IL-4 mostró un incremento significativo del 104.65 % (0.9 pg/mL) a partir del día siete de cultivo que se mantuvo hacia el día 14, en comparación con el control negativo, en el T14 es donde se observa la mayor diferencia significativa en las concentraciones de ésta citocina entre ambos grupos (-NKB) (Gráfico 5-a). La principal actividad biológica que se ha atribuido a la IL-4 es su función como factor antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF- α , IL-6 y la proteína inflamatoria del macrófago. Este efecto es consistente con los resultados de este estudio, dado que al día siete en el cual se incrementa la secreción de IL-4 coincide con la disminución de IL-6 y TNF- α y cuando IL-4 presenta una baja secreción al día 3 de cultivo, IL-6 y TNF- α presentan un pico máximo de secreción (Gráfico 5-d, Gráfico 6-a, Gráfico 7), lo cual es congruente con el efecto estimulante de la formación ósea que ha mostrado IL-4.

Por otro lado, IL-10 mostro una cinética de secreción semejante en presencia y ausencia de NKB, dicha cinética de secreción mostro un pico máximo al día tres de cultivo y un descenso al día 7 de cultivo celular (Gráfico 5-b). Este incremento en la

secreción de IL-10 al día 3 de cultivo puede relacionarse a su actividad promotora de la diferenciación osteoblástica, dado que se ha demostrado que IL-10 inhibe el proceso de osteoclastogénesis, tanto directa como indirectamente. Directamente IL-10 actúa inhibiendo la expresión de NFATc1 y TGF- β actúa atenuando la señalización RANKL-RANK e induce un aumento en la expresión de osteoprotegerina (OPG), la cual es segregada por los osteoblastos y actúa inhibiendo la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores de osteoclastos, bloquea la activación de los osteoclastos maduros e induce a su apoptosis [66.], indirectamente éstas citocinas al inhibir el proceso inflamatorio e inactivar las células inmunes también inhiben la resorción ósea, favoreciendo la diferenciación osteoblástica (11,36).

La IL-6 se comportó de igual manera que TNF- α , no obstante es importante destacar que fue la citocina que se presentó en mayor concentración tanto en el cultivo experimental como en el grupo control (Gráfico 6). Esta citocina, es conocida por su acción pleiotrópica, su actividad principal es activar la proteína gp130 con la cual estimula la osteoclastogénesis y promueve la reabsorción ósea, lo cual ha sido demostrado en condiciones patológicas: La participación de IL-6 en la diferenciación osteoblástica es inductiva, aunque a la fecha, se desconocen los mecanismos que permiten el acoplamiento de la actividad osteoclástica y osteoblástica [59]. La cinética de secreción de IL-6 mostró un cambio significativo del grupo experimental (+ NKB) en comparación con el grupo control (- NKB) al día 3 de cultivo. Este efecto es consistente con reportes previos en los cuales se ha reportado que la presencia de IL-6 estimula la expresión del gene maestro de la osteogénesis, el CBFA-1, el cual también es estimulado por la presencia de NKB como lo demostró Rodríguez y colaboradores [5].

13. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, se logró identificar y cuantificar las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12(p70), IFN- γ y TNF- α en el cultivo de CTM-MA. La determinación de la cinética de secreción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, demostró que las CTM-MA cultivadas en presencia de NKB secretan citocinas inflamatorias como IL-2 y TNF- α , las cuales disminuyen hacia el día 14 de cultivo, este resultado sugiere que NKB promueve la diferenciación osteoblástica a través de modular un proceso inflamatorio, lo cual se ha relacionado con los procesos regenerativos.

Aunado a esto, la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-4 presento un incremento al día 7 de cultivo celular, el cual se mantuvo hacia el día 14 del estudio. Este incremento fue significativamente mayor en los cultivos con NKB en comparación con el grupo control (- NKB). El análisis del perfil de secreción de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias, IL-2 y TNF- α , e IL-4 respectivamente permiten apreciar que en la etapa de mayor secreción de citocinas proinflamatorias se presenta una disminución de citocinas antiinflamatorias (T3), del mismo modo cuando las citocinas antiinflamatorias presentan su máxima secreción, las citocinas proinflamatorias exhiben una secreción baja (T7). Este hallazgo indica que NKB modula el proceso inflamatorio favoreciendo la diferenciación celular y probablemente la regeneración ósea.

De manera conjunta, la secreción de IL-10 presentó un máximo de expresión al día 3 de cultivo, mientras que la IL-6 presento un mínimo de expresión a este tiempo, este efecto reafirma la hipótesis de que NKB promueve la diferenciación osteoblástica a través de la modulación del proceso inflamatorio, dado que IL-10 inhibe osteoclastogénesis e incrementa la osteoprotegerina, mientras que la IL-6 incrementa la expresión del gene maestro de la osteogénesis, el CBFA- β , el cual es inducido por la presencia de NKB como ha sido demostrado en estudios previos.

Estos resultados plantean un posible nexo entre el comportamiento de las citocinas y la aparición de las proteínas características del fenotipo osteoblástico como CLG

y ALP, lo cual se analizará a través del estudio de los cambios en el proteoma celular inducidos por NKB.

De manera conjunta, se reafirmó a la MA como óptima fuente de extracción de CTM-MA, dado que las células obtenidas de esta fuente, son principalmente CTM, lo cual fue demostrado por los ensayos de clonogenicidad, diferenciación osteoblástica e inmunotipificación de marcadores de superficie. Además de esto, se determinó que las CTM-AM obtenidas conservan la capacidad de proliferar en cultivo, en ausencia y con NKB.

14. Perspectivas

El hallazgo principal de este trabajo demostró que es probable que NKB al actuar como biomaterial osteoinductor promueve una modulación en la secreción de citocinas por parte de las CTM-MA, sería conveniente consolidar este hallazgo, ampliar el tamaño de la muestra además de realizar la determinación de citocinas adicionales que se ha demostrado juegan un papel clave en la diferenciación osteoblástica como la IL-1 β y la IL-13, así como realizar un seguimiento de la expresión tanto proteica como génica de estas citocinas a 21 días de cultivo, que es el tiempo en el cual se alcanza el estadio de diferenciación osteoblástica en modelos *in vitro*.

15. Referencias

1. Greenblatt, M. y Jae-Hyuck, Shim, *Osteoimmunology: a brief introduction*. Immune Network, 2013. 13:111-115.
2. Rauner, M., Sipos, W. y Pietschmann, P., *Osteoimmunology*. International Archives of Allergy and Immunology, 2007. 143:31-48.
3. Mori, G., D'Amelio, P., Faccio, R. y Brunetti, G. *The interplay between the bone and the immune system*. Clinical and Developmental Immunology. 2013.2013:1-16
4. Stevens, M., *Biomaterials for bone tissue engineering*. Materials Today. 2008.11:18-25.
5. Rodríguez, N., Rodríguez, A., Enríquez, J., Alcántara, L., Fuentes, L., Piña, M., Zepeda, A., y Ambrosio, J., *Nukbone ® promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2013.434:676-680.
6. Piña, M., Murguía, N., Palma, R. y Lima, E., *Caracterización de hueso de bovino anorgánico: Nukbone*. Acta Ortopédica Mexicana. 2006.20:150-155.
7. Biocriss S. A. de C. V. México Extraído de <http://biocriss.com/index.html>. Consultado el 15 de Marzo del 2015.
8. Fernández-Tresguerres, I., Alobera, M., Del Canto, M. y Blanco, Luis., *Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo*. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal. 2006.11:47-51.
9. Witwicka, H. Hwang, S.Y. y Odgre, P. *The structure of bone*. Reference Module in Biomedical Sciences. 2014.4:392-400.
10. Álvarez, J. *Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción*. Revista de Estudios Transdisciplinarios. 2009.1:98-109.
11. Megías, M., Molist, P, y Pombal, M. *Atlas de histología vegetal y animal*. Universidad de Vigo. 2014. España Extraído de <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>. Consultado el 17 de Marzo del 2015.
12. Sobotta, W. *Histología*. Médica Panamericana, España. 2008. pp 135-137

13. Fitzgerald, R. *Ortopedia*. Médica Panamericana, Argentina. 2004. Tomo 1, pp. 167.
14. Reynaga, B. y Zeni, S. *Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2009.43:177-193.
15. Izquierdo, M. *Biomecánica y bases neuromusculares de la actividad física y el deporte*. Argentina. Médica Panamericana. 2008. pp. 33-53.
16. Anzaldúa, A., Juárez, M., Villaseñor, H., Ríos, M., Cornejo, M. y Meraz, M. *¿Qué son las células troncales o células madre?*. Veterinaria México. 2007.38:81-104.
17. Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. y Sánchez-Monroy, V. *Generalidades y aplicaciones de las células madre*. Perinatología y Reproducción Humana. 2013.27.194-199.
18. Qin, Y., Guan, J. y Zhang, C. *Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration*. Postgraduate Medical Journal. 2014.90:543-647.
19. Lacouture, M. *Optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea humana, en Facultad de Ciencias*. Pontifica Universidad Javeriana: Bogotá. 2008
20. Da Silva, M., Caplan, A. y Beyer, N. *In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells*. Stem Cells. 2008.26:2287-2299.
21. Kern, S. Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H. y Beiback, K. *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells. 2006.24:1294-1301.
22. Dominici, M., Le Blac, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. y Horwitz, E. *Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement*. 2005.7:393-395.
23. Zhu, Y. *Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials*. Stem Cells. 2014.5:48
24. Makhoul, G. et al. *Placental mesenchymal stem cells: a unique source for cellular cardiomyoplasty*. The Society of Thoracic Surgeons. 2013.95:1827-1833.

25. SPA Electronico Latinoamerica, Extraído de <http://spaelectronico.com.mx/>
Consultado el 20 de marzo del 2015.
26. Páez, D., Arévalo, J., Rodríguez, V. *Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea*. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 2007.5-114-126.
27. Flores, I. *Caracterización biológica de las células mesenquimales, en Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. Instituto Politécnico Nacional: México. 2010
28. Doncheva, D., Popov, C., Mutschler, W. y Schieker, M. *Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system*. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2006.11:21-38.
29. Airas, L., Niemelä, J., Salmi, M., Puurunen, T., Smith, D. y Jalkanene, S. *Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70- kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells*. The Journal of Cell Biology. 1997.136:421-431.
30. Kisselbach, L. y Merges, M. *CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblast from cell cultures*. Cytotechnology. 2009.59:31-44.
31. García, C. *Aislamiento y caracterización de las células madre de membrana amniótica. Una nueva fuente para terapia celular e inmuno-modulación*. Universidad de Murcia: España. 2012
32. Jane, B., Lian, G. *Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast grow and differentiation*. The Iowa Orthopaedic Journal. 1995.15:118-140.
33. Villegas, K. *Caracterización de la expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular, en células ROBmtret y MC3T3*. Universidad de Chile. 2008.
34. Amini, A., Laurencin, C. y Nukavarapu, S. *Bone tissue engineering: recent advances and challenges*. Critical Reviews Biomedical Engineering. 2012.40:363-408.

35. Fernández, R. *Caracterización funcional parcial de un péptido biomimético RDG con dominio de afinidad por el colágeno I para fines de regeneración ósea*. Universidad Internacional de Andalucía. 2013.
36. Mouris, A., Damsky, C., Lull, J., Zimmerman, D., Doty, S., Aota, S. y Globus, R. *Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation*. Journal Cell Science. 1996.6:1369-1380.
37. Dominguez, A. y Torres, C. *Descripción histológica de la regeneración ósea en conejos implantados con hueso de bovino liofilizado (NUKBONE®)*. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. 2006.5:27-35.
38. Cuerva-del Castillo, J. Valdés-Guitierrez, G., Elizondo-Vázquez, F., Pérez-Ortiz, O., Puña, M. y León-Mancilla, B. *Tratamiento de pérdidas óseas, pseudoartrosis, artrodesis y tumores óseos benignos con un xenoinplante mexicano (estudio clínico)*. Cirugía y Cirujanos. 2009.77:287-291.
39. Hughes, F., Turner, W., Belibasaki, G. y Martuscelli. *Efectos de los factores de crecimiento y de las citocinas sobre la diferenciación de los osteoblastos*. Periodontology. 2000. 15:48-72.
40. Academia Mexicana de las Ciencias. *Envejecimiento de la población aumenta por enfermedades del hueso*. Boletín AMC. México. 2015. Extraído de <http://www.comunicacion.amc.edu.mx/> consultado el 2 de Abril del 2015
41. García-López, G., García-Castro, I., Avila-González, D., Molina-Hernández, A., Flores-Herrera, H., Merchant-Larios, H. y Días-Martínez, F. *Las células del epitelio amniótico humano (CEAh) como posible fuente de células troncales (CT)*. Gaceta Médica de México. 2015.151:66-74.
42. In't Anker, P., Scherjon, S., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G., Claas, F., Fibbe, W. *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. Stem Cells. 2004. 22:1338-45.
43. Daculsi, G., Follah, B., Miramond, T. y Durand, M. *Osteoconduction, osteogenicity, osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes*. 2013. 34:346-348.
44. Vanegas, J. *Modelo Matemático de la osteointegración de un implante dental*. Universidad Nacional de Colombia. 2010.

45. Kindt, T., Goldsby, R. y Osborne, B. *Inmunología de Kuby*. McGraw Hill. México. 2007. pp. 302.
46. Filella, X., Molina, R. y Ballesta, A. *Estructura y función de las citocinas*. Medicina Integral. 2002.39:63-71.
47. Leyva-Leyva, M., Barrera, L., López-Camarillo, C., Arriaga-Pizano, L., Orozco-Hoyuela, G., Carrillo-Casas, E., Calderón-Pérez, J., López-Días, A., Hernández-Aguilar, F., González-Ramírez, R., Kawa, S., Chimal-Monroy, J. y Fuentes-Mera, L. *Characterization of mesenchymal stem cells subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential*. Stem Cells and Development. 203.22:1275-1287.
48. O'Brien, J., Wilson, I, Orton, T. y Pognan, F., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur. J. Biochem. 200.267:5421-5426.
49. Munévar, J., Becerra, A. y Bermúdez Olaya. *Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica*. Acta Odontológica Venezolana.2008.43:1-12.
50. Instituto de Hematología e Inmunología. *Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales*. Cuba. 2010. Extraído de http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol26_4_10/hih02410.htm Consultado el 12 de Abril del 2015
51. Fuentes, M. *Optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea humana*. Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá.2008
52. Arévalo, J. y Páez, D. *Cultivo de células madre mesenquimales a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea*. Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá.2007
53. García, D. *Efectos de la utilización de membrana amniótica en fresco en la regeneración condral en ovejas*. Universidad Complutense de Madrid: España. 2012.

54. Gil-Loyzaga, P. *Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa*. España. 2011. pp 66
55. Díaz, S. et. al. *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane*. Tissue Engineering.2007.17.22
56. Flores-Figueroa, E., Montesinos, J. y Mayani, H. *Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica*. Revista de Investigación Clínica.2006.58:500-501.
57. Sanjurjo, C. *Diferenciación in vitro de las células madre aisladas de médula ósea humana sobre biomateriales de colágeno*. Universidad de Coruña. España. 2012
58. Aguado, P. *Lo que el clínico debe saber sobre los mecanismos de conexión entre la inflamación y la formación de hueso. ¿Es suficiente el bloqueo de la inflamación para prevenir la osificación?* Reumatología clínica. 2010.6.28.32. Consultado el 22 de Abril del 2015.
59. Lacey, D., Simmons, P., Graves, S. y Hamilton, J. *Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation*. Osteoarthritis and Cartilage. 2009.17.735-742.
60. Yi-Ping, L y Stashenko, P. *Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and IL-6, but not IL-1, down-regulate the osteocalcin gene promoter*. Journal of Immunology.1992.148.788-794.
61. Reyes, R., Rozas, P. y Muñoz-Torres, M. *Regulación del proceso de remodelado óseo*. Unidad de metabolismo óseo. REEMO. 2008.12.10-14.
62. Zhang, Q., Chen, B., Guo, J., Zhu, X., Ma, S. y Yang, W. *Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases*. BioMed Research International.2014.2014.1-5.
63. Rodríguez-Fuentes, N., Reynoso-Ducoing, O., Rodríguez-Hernández, A., Ambrosio-Hernández, J. R., Piña-Barba, M. C., Zepeda-Rodríguez, A., et al. *Isolation of Human Mesenchymal Stem Cells and their Cultivation on the Porous Bone Matrix*. J. Vis. Exp. (96), e51999, doi:10.3791/51999.2015.
64. Karsenty, G. *The genetic transformation of bone biology*. Genes & Development. 1999.3037-3051.

65. Moreno, S. y Contreras A. *Molecular mechanisms involved in bone destruction in periodontitis. Literature review.* Periodoncia. Implantol. Rehabil. Oral. 2013.6.142-147.
66. Ferrer, J., Tovar, I., Martínez, P. *Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿el futuro del metabolismo óseo?*. An Med Interna. 2002.19:385-388.