



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN

TÍTULO:

“ANDAMIOS DESCELULARIZADOS DEL NOPAL (*OPUNTIA FICUS-INDICA*) Y SU EFECTO BIOLÓGICO EN CULTIVO CON CÉLULAS TRONCALES PULPARES DENTALES HUMANAS (*hDPSC*)”

MODALIDAD DE TITULACIÓN:
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

RUTH BETSABE ZAMUDIO CEJA

TUTOR: Dr. RENÉ GARCÍA CONTRERAS

ASESOR: C.D. HUGO ALVARADO GARNICA



LEÓN, GUANAJUATO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tabla de contenido

Resumen	8
Abstract.....	9
1. Introducción	10
2. Marco teórico.....	12
2.1. Nopal.....	12
2.1.1. Farmacéutica	12
2.1.2. Industria Alimentaria	13
2.1.3. Nutrición animal	13
2.2. Ingeniería de tejidos	13
2.3.1. Andamios naturales de origen vegetal	15
2.4. Descelularización	15
2.5. Células troncales mesenquimales.....	17
2.6. Células troncales mesenquimales dentales	17
2.7. Células troncales pulpares dentales humanas (<i>hDPSC</i>)	18
2.9. Microscopía.....	19
2.9.1. Microscopio óptico	20
2.9.2. Microscopio electrónico de barrido (<i>SEM</i>)	20
2.10. Ensayo de proliferación celular	21
2.10.1 Método (MTT)	22
2.11. Espectrofotometría de <i>UV-Vis</i>	22
2.11.1. Absorbancia de las soluciones	23
2.12. Efecto pro-inflamatorio	23
2.13. Ciclooxygenasa I y Ciclooxygenasa II	24
2.14. β -Actina	24
2.15 Western Blot	25
3. Antecedentes	26
4. Planteamiento del problema.....	27
5. Pregunta de investigación	27
6. Justificación	28
7. Hipótesis de investigación	28

8. Objetivos	29
8.1. Objetivo general	29
8.2. Objetivos específicos	29
9. Diseño de estudio.....	30
9.1. Tipo y diseño de estudio.....	30
9.2. Criterios de selección	30
9.3. Variables.....	30
10. Metodología experimental.....	32
10.1. Obtención y descelularización del tejido de nopal (<i>Opuntia Ficus- Indica</i>).....	32
10.2. Caracterización de andamios descelularizados de nopal.....	33
10.3. Degradación enzimática e hidrolítica de los andamios.....	33
10.4. Subcultivo de células <i>hDPSC</i>	34
10.5. Inoculación de las <i>hDPSC</i> sobre los andamios	34
10.6. Proliferación de las <i>hDPSC</i> en contacto con los andamios	34
10.7. Características morfológicas de las <i>hDPSC</i> en contacto con los andamios	35
10.8. Ensayo pro-inflamatorio.....	35
10.8.1. Obtención y cuantificación de proteínas	35
10.8.2. Western Blot.....	35
10.9. Análisis estadístico	38
11. Resultados	39
11.1. Descelularización del nopal	39
11.2. Degradación de los andamios.....	40
11.4. Morfología de las <i>hDPSC</i> en contacto con los andamios	42
12. Discusión	45
13. Conclusiones	47
14. Anexos.....	48
15. Referencias Bibliográficas.....	53

Dedicatoria

Al pilar de mi familia, mi mamá.

Por ser mi motor para seguir esforzándome, para ser mejor tanto en el ámbito profesional como personal. Por su apoyo y esfuerzo para que su hija tuviera una carrera universitaria, por creer en mis capacidades y habilidades para lograrlo. Por ser el claro ejemplo de superación y de triunfo en la vida. Por alentarme a finalizar con mi trabajo de tesis, y así poder obtener mi grado de licenciatura.

A mis hermanas, Ale y Mons.

Por su motivación para alentarme a nunca darme por vencida, por su apoyo para cumplir mis sueños y metas. Por preguntarme como estaba y como me había ido siempre que regresaba a casa. Por darme el ejemplo de que si luchas y pones esfuerzo en algo el resultado siempre será favorable.

A la niña de la casa de 4 patitas, mi cassie.

Por estar esperándome siempre que regresaba a casa, por su ternura, por ser mi amiga y perrhija, por demostrarme que el amor hacia un animalito existe.

Agradecimientos

No ha sido fácil llegar a donde estoy, es por eso que quiero agradecer principalmente a mi familia, a mi mamá, mis hermanas por su apoyo incondicional porque a ellas les debo este logro y con ustedes lo comparto, doy gracias a Dios por permitirme concluir esta gran etapa de mi vida. También quiero decir gracias a mi persona especial Misael, que conocí en esta parte de mi vida, la universidad, gracias por ayudarme y apoyarme en lo que necesitara, siempre estuviste alentándome sobre lo que era capaz de hacer.

También quiero expresar mis agradecimientos a la ENES León, UNAM por hacerme parte de la máxima casa de estudios superiores, al personal del Laboratorio de investigación Interdisciplinario, Área de Nanoestructuras y Biomateriales por brindarme su apoyo, también de forma especial agradecer a mi tutor y asesor por su trabajo al asesorarme y permitirme realizar mi proyecto de investigación culminándolo en mi tesis. Gracias a DGOAE UNAM por la beca de titulación por proyecto de investigación brindada porque fue un apoyo para el término de mi tesis.

Doy gracias por mi crecimiento y evolución, por todas las enseñanzas experimentadas. Por quien hoy soy y por todo lo que hace parte de mi vida y me dispongo a luchar por los próximos retos que vengan, porque sé que con esfuerzo todo lo que me proponga lo puedo lograr.

Por mi raza
hablará el espíritu.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
μL	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopio de fuerza atómica
anti-COX 1	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-COX 1
anti-COX 2	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-COX 2
ASC	Células troncales adultas/posnatales
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
CaCl_2	Cloruro de calcio
cm	Centímetros
CPD	Secado en el punto crítico
DEPC	Células precursoras del folículo dental
dH_2O	Agua destilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETOH	Etanol
ESC	Células troncales embrionarias
GA	Glutaraldehído
GAGS	Glucosaminoglucanos
g	Gramos
h	Horas
hDPSC	Células troncales pulpares dentales humanas
H_2O	Agua
IFN γ	Interferón Gamma

IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
iPSC	Células troncales pluripotentes inducidas
ISSCR	Sociedad Internacional para la Investigación de Células Madre
IT	Ingeniería de tejidos
KDa	Kilodaltons
MEC	Matriz extracelular
MEM	Minimum Essential Médium Eagle
mg/mL	Miligramo por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MSC	Células troncales mesenquimales
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
ng/mL	Nanogramos por mililitro
nm	Nanómetro
OMS	Organización mundial de salud
Opuntia spp	Opuntia ficus-indica
OsO ₄	Tetróxido de osmio
PBS 1X	Tampón fosfato salino 1X
PBST	Tampón fosfato salino con Polisorbato 20 (Tween 20)

PDLSC	Células troncales del ligamento periodontal
PSA	Solución de persulfato de amonio
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	Fluoruro de Polivinilideno
ROG	Regeneración Ósea Guiada
rpm	Revoluciones por minuto
RTG	Regeneración Tisular Guiada
SCAP	Células troncales de la papila apical
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel para electroforesis de poli(acrilamida y dodecilsulfato de sodio)
s	Segundos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SHED	Células troncales de dientes deciduos exfoliados
TA	Temperatura ambiente
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris HCl	Clorhidrato de Tris(hidroximetil)aminometano
UV-VIS	Luz ultravioleta visible
V	Voltios
WB	Western Blot

Resumen

Introducción: Se han logrado grandes y significativos avances en la fabricación de andamios para su aplicación en ingeniería de tejidos (IT), sin embargo, la entrega de nutrientes en tejidos complejos, sigue siendo un desafío. Aprovechando las similitudes en la estructura vascular de los tejidos vegetales con los animales, se han diseñado andamios con propiedades regenerativas a partir del tejido vegetal descelularizado. El nopal, es una cactácea originaria de México que ha demostrado propiedades antioxidantes, analgésicas, antiinflamatorias, anticarcinogénicas, antivirales y efectos regenerativos, que son prometedoras para su implementación en el diseño de andamios para la IT.

Objetivo: Conocer algunos de los efectos biológicos de los andamios descelularizados de nopal como degradabilidad, biocompatibilidad, bioactividad y efecto pro-inflamatorio en interacción con *hDPSC*.

Metodología: Se obtuvieron andamios a partir de bloques del tejido del parénquima del nopal, que fueron descelularizados con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.5 % y agitación a 180 rpm. Se evaluó la degradación hidrolítica y enzimática del andamio por absorbancia de las soluciones y comparación del peso inicial/peso final después de 240 h de agitación a 360 rpm en PBS y tripsina al 0.5 %. Se realizó caracterización mediante microscopía óptica y *SEM*. Las características morfológicas de las *hDPSC* sobre los andamios, se observaron mediante tinción con cristal violeta y *SEM*. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo biológico por el método MTT y la medición de la absorbancia a 570 nm. El posible efecto pro-inflamatorio se evaluó por detección de las proteínas pro-inflamatorias COX I y II, mediante Western Blot.

Resultados: Con la descelularización, se obtuvieron estructuras porosas con características positivas a celulosa. En la degradación el grupo de andamios descelularizados presentó una pérdida de peso al 70 % a las 240 h relacionada con el aumento en la absorbancia. La descelularización con SDS al 0.5 % permitió el aislamiento de la matriz extracelular del tejido de nopal. Se observó que las células invaden la superficie de los andamios y existe un aumento en la cantidad de estas, más marcado a partir de las 120 h. Se demostró la expresión de proteínas COX I, COX II en el ensayo pro-inflamatorio teniendo como control β -Actina.

Conclusión: Los andamios de nopal permitió la obtención de un andamio que favoreció la proliferación en cultivos *hDPSC in vitro*. También se comprueba sus propiedades biodegradables mediante el ensayo de degradación y su biocompatibilidad en el ensayo de proliferación y al resultar negativas las pruebas de expresión de proteínas inflamatorias. Con estos resultados se puede afirmar su potencial aplicación en la medicina regenerativa.

Palabras clave: ingeniería de tejidos, Andamios, Planta, tejido vegetal, nopal (*Opuntia ficus-indica*), descelularización, células troncales pulpares dentales humanas, degradabilidad, biocompatibilidad.

Abstract

Introduction: Great and significant advances have been made in the manufacture of scaffolds for their application in tissue engineering, however, the delivery of nutrients in complex tissues remains a challenge. Taking advantage of the similarities in the vascular structure of plant tissues with those of animals, scaffolds with regenerative properties have been designed from decellularized plant tissue. The nopal is a cactus native to Mexico that has shown antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, anticarcinogenic, antiviral and regenerative effects that are promising its implementation in the design of scaffolds for TI.

Objective: The main objective is to identify some of biological effects of decellularized cactus scaffolds when put in contact with human dental pulp stem cells (hDPSC), in addition to generate information that will serve for future research focused on its potential as a biomaterial in regenerative therapies.

Methodology: Scaffolds were obtained from blocks of parenchyma of the nopal tissue, which were decellularized with a solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) at 0.5% and agitation at 180 rpm. The hydrolytic and enzymatic degradation of the scaffold was evaluated by absorbance of the solutions and comparison of the initial weight/ final weight after 240 h of agitation at 360 rpm in PBS and 0.5% trypsin. Characterization was performed by optical microscopy and SEM. The morphological characteristics of the hDPSC on the scaffolds were observed by crystal violet staining and SEM. Cell viability was determined by biological assay using the MTT method and absorbance measurement at 570 nm. The possible pro-inflammatory effect was evaluated by detection of the pro-inflammatory proteins COX I, COX II by Western Blot.

Results: With decellularization, porous structures with cellulose positive characteristics were obtained. In the degradation, the group of decellularized scaffolds presented a weight loss of 70% at 240 h related to the increase in absorbance. Decellularization with 0.5% SDS allowed the isolation of the extracellular matrix from the nopal tissue. It was observed that the cells invade the surface of the scaffolds and there is an increase in their number, more marked after 120 h. The expression of COX I, COX II proteins was demonstrated in the pro-inflammatory assay having β actin as control.

Conclusion: The nopal scaffolds allowed obtaining a scaffold that favored proliferation in *hDPSC in vitro*. Its biodegradable properties are also verified by means of the degradation test and their biocompatibility in the proliferation test and when the inflammatory protein expression tests are negative. These results can feed its potential application in regenerative medicine.

Keywords: Tissue engineering, scaffolds, plant, plant tissue, nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) decellularization, human dental pulp stem cells, degradability, biocompatibility.

1. Introducción

El nopal es una cactácea originaria de México utilizada desde la época prehispánica como alimento y medicamento, actualmente a nivel nacional existen 3 millones de hectáreas de nopal nativo y alrededor de 233 000 hectáreas de nopal cultivado (1), siendo México, el principal productor y consumidor de nopal en el mundo (3). Es una planta arbustiva de tronco leñoso y ramas que se forman por cladodios. La epidermis del nopal tiene dos capas, una constituida por células verdes llamada clorénquima y la segunda capa es interna formada por un cilindro de células blancas conocido como parénquima, en el cual existen células mucilaginosas llamadas así, porque su principal función es el almacenamiento de mucílago. Su composición química en base húmeda es de 91 % agua, 0.66 % proteínas, 0.11 % grasas, 5.5 % carbohidratos y 1.15 % celulosa (1). Adicionalmente, dentro de los beneficios que se atribuyen al consumo de nopal se observa que en personas diabéticas se ve favorecido el decremento en los niveles de glucosa postprandial debido a su alto contenido de fibra, así como una mejoría en los mecanismos de pectinas que absorben la glucosa intestinal (1). Por otro lado, se ha visto que presenta propiedades antioxidantes, analgésicas (2), antiinflamatorias, anticarcinogénicas, antivirales y efectos regenerativos, esto último debido a su contenido de carotenoides, flavonoides, fenoles, vitamina A y E (1). Gracias a estas propiedades, el nopal, es considerado una planta con gran potencial para su aplicación en la medicina, siendo una materia prima accesible para el desarrollo de nuevos biomateriales.

Una de sus posibles aplicaciones está enfocada en ingeniería de tejidos (IT), que se define como un área multidisciplinaria, que tiene como objetivo crear estructuras tridimensionales que funcionan como órganos y/o tejidos originales, mediante células, nutrientes de sostén y factores de crecimiento que permiten las funciones celulares normales [Kasper 2016]. Las estrategias de síntesis están basadas en la combinación de biomateriales con un diseño similar al tejido dañado, con factores bioquímicos apropiados e incluso con células del propio paciente que permiten la regeneración en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* (5).

En las últimas décadas, la ingeniería de tejidos ha conceptualizado su trabajo, estableciendo criterios que incluyen el diseño y fabricación de biomateriales usados como andamios, el aislamiento y caracterización celular, la proliferación, diferenciación y el uso de biorreactores, entre otras (4). En relación a los andamios, estos son definidos en ingeniería tisular como una estructura tridimensional que actúa como sustituto de la matriz extracelular en cultivos celulares, lo que permite controlar los estímulos mecánicos que se reciben. Su principal función es estimular y dirigir el crecimiento, ya sea sembrando células madre en su superficie o una biomolécula que estimule dicho crecimiento (6). En la actualidad el uso de andamios para el cultivo celular *in vitro* ha ganado importancia y se ha extendido a muchos estudios de investigación científica relacionados con la regeneración de tejidos, demostrando resultados favorables principalmente en tratamientos regenerativos de cartílago, hueso y piel (4).

Los andamios pueden ser fabricados empleando polímeros sintéticos como: ácido *L*-Láctico, ácido glicólico, polietilenglicol, etc., o naturales como: alginato, quitosano, colágeno, elastina, fibrina, fibronectina, seda, celulosa (7); metales como: aleaciones cromo-cobalto, titanio, nitinol y aceros inoxidables (8), o materiales compuestos como lo son los inorgánicos biocerámicos, entre ellos la hidroxiapatita y el fosfato de calcio (4). La elección del material para su fabricación dependerá de las propiedades del tejido a reemplazar. En este contexto, el material utilizado en la confección de los andamios para ingeniería de tejidos debe presentar alta porosidad, gran área superficial, rigidez superficial elevada, forma específica tridimensional y biodegradabilidad (6). En este punto cabe destacar que los polímeros de origen natural vegetal presentan ventajas significativas sobre los sintéticos y los de origen animal (8).

Se describen muchos métodos para la elaboración de andamios donde sobresale la descelularización que se trata de la eliminación de células junto con sus membranas lipídicas y nucleares de tejidos nativos, que permite conservar su composición, así como las propiedades biológicas y mecánicas de los extractos tridimensionales (3D) ricos en proteínas y matriz extracelular (MEC) (9). Se sabe que la MEC está compuesta por una red compleja de proteínas estructurales (colágeno y elastina), proteínas especializadas (fibrina, fibronectina y laminina), proteoglicanos (sulfato de heparina, de condroitina, de queratina y Glucosaminoglucanos o GAGS) y factores de crecimiento (9). Las matrices descelularizadas también llamadas andamios biológicos derivados de tejidos nativos, conservan las características estructurales y las proteínas funcionales de la MEC (10). Existen distintas estrategias (químicas, físicas y enzimáticas) para descelularizar un tejido u órgano, y a veces estas se combinan para mejorar su eficacia y poder aislar una MEC *de forma* intacta (9).

El éxito de la eliminación de las células de los tejidos depende de la fuente de obtención, composición y densidad del tejido, así como el protocolo de descelularización elegido según el tipo de tejido (9). Dentro de los diferentes tipos de métodos que se utilizan para la descelularización son el método de perfusión de órganos completos para tejidos gruesos 3D u órganos completos, método de inmersión y agitación para tejidos delgados y la descelularización basada en gradiente de presión para tejidos huecos, y el uso de fluido supercrítico para facilitar el uso a largo plazo (9). El enfoque más comúnmente usado es la inmersión en agentes de descelularización mientras se los somete a agitación (11). Para tejidos vegetales se describe ampliamente el uso de SDS como agente para la descelularización por inmersión y agitación.

Los andamios biológicos compuestos MEC se han utilizado en una variedad de aplicaciones quirúrgicas reconstructivas y cada vez más en estrategias de medicina regenerativa para el reemplazo de tejidos y órganos, preparados por descelularización (11).

El uso de plantas y sus extractos para el diseño de andamios, ha sido tema de varias investigaciones pero siempre existe el interés de caracterizar nuevos materiales de origen natural, razón por la que en este trabajo se llevó a cabo un estudio detallado con el fin de desarrollar una tecnología verde, a través del uso del extracto de cladodios de nopal (*Opuntia spp.*)(12).

2. Marco teórico

2.1. Nopal

Nuestro país, es el principal productor y consumidor del nopal en el mundo (3). Se desarrolla en zonas áridas y semiáridas, gracias a su capacidad de crecer en zonas con temperaturas extremas se utilizan en programas para la reforestación, existen más de 300 especies del género *Opuntia* y 100 se encuentran en México, pero solo de 10 a 12 de ellas han sido aprovechadas por el ser humano (1).

El nopal, es una planta arbustiva de tronco leñoso y ramas que se forman por cladodios, que si son frescos son llamados nopalitos y de pencas si se encuentran adultos. La epidermis del nopal tiene dos capas, una de células verdes, llamada clorénquima y otra interna que está formada por un cilindro de células blancas conocido como parénquima; dentro del parénquima existen tejidos formados por células mucilaginosas, que reciben el nombre por su función de almacenar mucílago. Es considerado un alimento con grandes efectos benéficos para la salud, por mencionar un ejemplo se ha reportado que el consumo de nopal por personas diabéticas favorece el decremento en la glucosa posprandial debido a su alto contenido de fibra y pectinas que absorben la glucosa intestinal (1). Por otro lado presenta propiedades antioxidantes, analgésicas (2), antiinflamatorias, anticarcinogénicas, antivirales y efectos regenerativos, por su contenido de carotenoides, flavonoides y otros fenoles así como vitamina A y E (1).

Debido a las características y propiedades que presenta, se puede utilizar de diferentes maneras, principalmente como alimento y medicamento, entre otras. A continuación, se presentan algunos de los usos que se le da en el día a día.

2.1.1. Farmacéutica

La Diabetes según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una enfermedad metabólica crónica que se caracteriza porque existe una deficiencia de insulina. La insulina es una hormona que mantiene controlada la concentración de glucosa en la sangre. Es por ello que la búsqueda de nuevas alternativas para tratarla ha llevado al uso del nopal. Estudios que se han realizado en personas diabéticas y animales demostraron que al consumir el nopal se observa un decrecimiento en la glucosa postprandial por lo que su efecto hipoglucemiante se debe un alto contenido de fibra soluble y pectinas, que pueden afectar conducir favorablemente la absorción de glucosa a nivel intestinal (1).

2.1.2. Industria alimentaria

Es un elemento tradicional en la dieta de los mexicanos, frecuentemente consumido como vegetal en ensaladas o como fruta fresca. Tomando en cuenta el grado de madurez del nopal, se pueden desarrollar aplicaciones como aditivos naturales para la industria alimentaria a partir del mucílago, ya que se obtienen espesantes, reemplazantes de grasas, estabilizadores de emulsiones, películas comestibles y recubrimientos para alargar la vida de anaquel y mejorar la calidad de alimentos frescos, congelados y procesados (1).

2.1.3. Nutrición animal

Es muy adecuado como alimento por su eficacia al convertir el agua en materia seca, es decir, en energía digerible. Ha desempeñado un papel muy importante para satisfacer la demanda de forraje en las regiones semiáridas desde hace muchos años. Debido a que las cactáceas tienen un sistema fotosintético especializado permite una producción más eficiente por unidad de materia seca y unidad de agua consumida; mayor a la que presentan pastos y leguminosas (1).

2.2. Ingeniería de tejidos

A pesar de los avances en la medicina moderna, muchas personas mueren cada año mientras esperan por trasplantes, esto, debido a la escasez de donantes de órganos y tejidos o de algún sustituto funcional (29). Es por ello que médicos y científicos han indagado sobre una solución a este problema, buscando en diferentes campos alternativas al trasplante de órganos (30).

En la búsqueda de estas alternativas, hace casi 30 años, se introdujo por primera vez el término “ingeniería de tejidos” por Langer y Vacanti, el cual tenía como propósito principal la regeneración de tejidos nuevos. La IT, es un campo formado por varias ramas como es la biología molecular, celular, la ciencia de los materiales, química, ingeniería y medicina, que ha surgido como el medio para sustituir órganos enfermos o dañados mediante la fabricación artificial de tejidos u órganos *in vitro* para ser trasplantados *in vivo* y así restaurar el daño (29).

Los elementos fundamentales que se requieren para lograr la reconstitución o regeneración de tejido dañado o enfermo son tres: (1) células, (2) andamios y (3) factores de crecimiento (31). Las células capaces de dar comienzo y sostener el proceso de regeneración son activadas a través de factores de crecimiento o genes, que inducen la formación de un nuevo tejido funcional. Para esto se necesita un andamio o matriz que le dé la forma arquitectónica necesaria al nuevo tejido para el sitio de la lesión o hacer uso de un

biorreactor vivo, donde la construcción de tejido resultante sea reimplantada en el paciente (29). Estos tejidos obtenidos mediante esta técnica son conocidos como biomateriales ya que de cierta forma igualan la función biológica y mecánica de la matriz extracelular que se localiza en los tejidos del cuerpo de forma natural (30).

Un biomaterial utilizado como andamio, debe ser biocompatible y biodegradable, estas características apoyan el reemplazo del tejido sin evocar una respuesta inflamatoria. También debe proporcionar un espacio tridimensional, en el cual las células se adhieran, crezcan y formen nuevos tejidos con la función y estructura correcta, así como permitir que el suministro de células y factores bioactivos lleguen a los lugares deseados del cuerpo (30).

Se han utilizado tres tipos de biomateriales para el diseño de tejidos los cuales son polímeros sintéticos, materiales de origen natural y matrices acelulares. Estos últimos dos presentan una ventaja potencial en el reconocimiento biológico, por otro lado, los polímeros sintéticos se pueden construir de forma reproducible a gran escala con propiedades controladas (30). De esta manera, el campo de la ingeniería de tejidos tiene mucho más por descubrir y avanzar ya que se van presentando nuevos desafíos que sin duda tiene el potencial para enfrentar con nuevos desarrollos innovadores que se puedan aplicar con éxito en el ser humano (29).

2.3. Andamios

En las últimas décadas, la ingeniería de tejidos ha conceptualizado su trabajo estableciendo criterios que incluyen el diseño y fabricación de andamios, el aislamiento y caracterización celular, proliferación y diferenciación celular, uso de biorreactores, etc. (4). Un andamio para ingeniería tisular es una estructura tridimensional que actúa como sustituto de la matriz extracelular y que permite controlar los estímulos mecánicos que reciben las células. Su función principal es estimular y dirigir el crecimiento celular, ya sea sembrando células madre en su interior o una biomolécula que estimule dicho crecimiento (6).

En la actualidad el uso de andamios para cultivo celular *in vitro* ha tomado importancia y se ha extendido a muchos estudios de investigación científica relacionados con la regeneración de tejidos, demostrando resultados favorables principalmente en tratamientos regenerativos de cartílago, hueso y piel (4).

Los andamios pueden ser fabricados empleando polímeros sintéticos como: ácido *L*-Láctico, ácido glicólico y polietilenglicol, naturales como: alginato, quitosano, colágeno, elastina, fibrina, fibronectina, seda (7); metales como: aleaciones cromo-cobalto, titanio, nitinol y aceros inoxidables (8), o materiales compuestos (utilizando materiales inorgánicos como las biocerámicas como lo son la hidroxiapatita y fosfato de calcio) (4). La elección del material para su fabricación dependerá de las propiedades del tejido a reemplazar. Las

características que tiene que tener el material para la elaboración de los andamios para IT es que debe tener una gran área superficial, alta porosidad, rigidez superficial elevada, estructura tridimensional y biodegradabilidad (6).

2.3.1. Andamios naturales de origen vegetal

Los andamios a base de plantas han presentado muchas ventajas que los han posicionado como biomateriales relevantes, ya que son fáciles de fabricar y manipular, son flexibles y se pueden cortar, moldear, enrollar, son económicos, renovables (21) (ya que evitan el exceso de residuos, el uso de energía, la contaminación y el tiempo) (22). Dentro de sus propiedades físicas se destaca una gran área de superficie, porosidad interconectada, redes vasculares naturales, diferentes rangos de rigidez y propiedades mecánicas (21) que son muy parecidas y se pueden adaptar al tejido del huésped (22). Desde una percepción bioquímica, los andamios vegetales están conformados principalmente de celulosa, que es un material biocompatible, no inmunogénico que permite la adhesión celular; y se ha demostrado que tiene función proangiogénica *in vivo*. Estudios recientes demostraron su potencial para repoblar con células humanas, por lo que destaca un interés por su uso en ingeniería de tejidos o para aplicaciones biomédicas (21).

La utilización de biomateriales descelularizados a base de plantas está fomentando al diseño de nuevas estrategias para la degradación controlada *in vivo*, ya que se ha comprobado que después del pretratamiento de hidrólisis y la administración conjunta de celulasas es posible obtener andamios de celulosa reabsorbibles en diferentes grados. También estos andamios tienen la capacidad de conservar su ultra estructura jerárquica, hidrófila e interconectada. (40)

Una ventaja de utilizar como andamios material vegetal a base de celulosa es la capacidad de construir sobre ésta construcción de tejido. Además, estudios previos han demostrado ciertas clases celulares, como las células endoteliales humanas, fibroblastos dérmicos, células madre mesenquimales, entre otras, se adhieren y sobreviven a estos andamios descelularizados vegetales durante varias semanas, por lo que la evidencia científica ha demostrado que el biomaterial vegetal ayuda a la diferenciación de células madre (22), así como también a la unión, expansión, alineación y diseño de las mismas células (40).

2.4. Descelularización

El proceso de descelularización consiste en la eliminación de las células y sus membranas lipídicas y nucleares conservando la composición de la matriz extracelular, las propiedades biológicas y mecánicas en los extractos tridimensionales ricos en proteínas (9). La matriz extracelular está compuesta por una red compleja de proteínas estructurales (colágeno y elastina), proteínas especializadas (fibrina, fibronectina y

laminina), proteoglicanos (sulfato de heparina, de condroitina, de queratina y GAGS) y factores de crecimiento. Se sabe que esta no induce antigenicidad o respuesta inflamatoria e inmune, responsable del rechazo de tejido lo que favorece el éxito de los andamios descelularizados tras la implantación. Se debe a las señales moleculares proporcionadas por los componentes de matriz extracelulares naturales (9).

El éxito de la eliminación de las células de los tejidos depende de la fuente, composición, densidad del tejido y el protocolo de descelularización que debe optarse según los tipos de tejidos. Existen diferentes métodos (químicos, físicos y enzimáticos) para lograr descelularizar un tejido u órgano; se ha reportado la combinación de dos o más técnicas, lo cual se hace con la finalidad de mejorar su eficacia (9) sin afectar al MEC. Las enzimas más utilizadas para la descelularización de tejidos son la nucleasa y la tripsina (10). Dentro de estos métodos, los más comunes han sido por el método de perfusión de órganos completos para tejidos gruesos 3D u órganos completos, método de inmersión y agitación para tejidos delgados y la descelularización basada en gradiente de presión para tejidos huecos, y el uso de fluido supercrítico para facilitar el uso a largo plazo (9).

La perfusión anterógrada o retrógrada se ha utilizado como técnica para la descelularización de órganos, conservando en gran medida la arquitectura tridimensional del órgano del que se aisló la MEC. Existen redes vasculares dentro de los órganos que minimizan la distancia de difusión del oxígeno a las células. Por lo tanto, la perfusión a través de la vasculatura es un método particularmente eficaz para administrar agentes descelularizantes a las células y para el transporte de material celular desde el tejido. La inducción de un gradiente de presión osmótica a través del tejido durante la descelularización se puede utilizar para complementar el tratamiento enzimático, lo que resulta en una preservación superior de la ultra estructura. El dióxido de carbono supercrítico elimina los residuos celulares cuando pasa a través de los tejidos a una velocidad controlada similar al secado en el punto crítico. El enfoque más común para tales tejidos es la inmersión en agentes de descelularización mientras se los somete a agitación (11).

El uso de MEC derivada de tejido descelularizado es cada vez más común en la medicina regenerativa y en las estrategias de ingeniería de tejidos, con aplicaciones recientes que incluyen el uso de andamios de MEC-3D preparados por descelularización de órganos completos (11).

Por otro lado, el dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente iónico que se utiliza como agente para la descelularización mediante el uso combinado de la agitación ya que esta, solubiliza las membranas celulares y nucleares con una tendencia a la desnaturalización de proteínas (11,19). Los efectos que produce en la MEC es que elimina los restos nucleares y las proteínas citoplasmáticos de los tejidos densos, altera la ultra estructura, elimina los GAG y los factores de crecimiento y genera un daño al colágeno. Cabe mencionar que la eliminación de las proteínas y el ADN de la MEC aumentan con el tiempo de exposición (11). Mediante este método se producen andamios con propiedades mecánicas comparables y bajo nivel metabólico celular. Es una técnica que se ha utilizado cada vez con más frecuencia para descelularizar tejidos de mamíferos, plantas y muestras delicadas porque se requiere una agitación física mínima (19).

2.5 Células troncales mesenquimales

Las células troncales (*MSC*) fueron utilizadas por primera vez en el área clínica a finales de 1960 (37). Su principal característica es la autorrenovación y/o su capacidad de pasar por distintas divisiones celulares mientras se mantienen en el estado indiferenciado. Además, las células madre producen células intermedias (células progenitoras o precursoras) que tienen la capacidad de diferenciarse en distintos linajes de células y generar tejidos u órganos completos. La diferenciación pasa cuando una célula madre adquiere características de una célula especializada (32). Éstas células a su vez, se dividen en células embrionarias (*ESC*) (32), células pluripotentes inducidas (*iPSC*) (33) y células adultas/posnatales (*ASC*) indiferenciadas que están en constante división.

Las líneas celulares embrionarias fueron informadas por Thomson y colaboradores en el año de 1998. Las células madres embrionarias se aíslan del blastocito durante el desarrollo embrionario, lo que da como resultado a las tres capas germinales primarias: ectodermo, endodermo y mesodermo. Son células pluripotentes o totipotentes con una capacidad ilimitada para diferenciarse y convertirse en cada una de las más de 200 tipos de células del cuerpo humano (32).

Por otro lado, las células madres adultas se encuentran en diferentes tejidos del cuerpo humano, como por ejemplo la médula ósea, el cerebro, vasos sanguíneos, hígado, piel, retina, páncreas, músculos, tejido adiposo y en los tejidos dentales. Se localizan en nichos específicos donde se produce la regulación de la proliferación, supervivencia, migración y envejecimiento. Estas células pueden dividirse y crear otra célula igual a ella e incluso más diferenciada, pero la capacidad de diferenciarse en otros tipos de células es limitada y a esto se le conoce como multipotente, característica que la hace diferente de las células madre embrionarias (32).

2.6. Células troncales mesenquimales dentales

Un diente se forma como resultado de la interacción de células ectodérmicas epiteliales orales (que forman el esmalte) y células mesenquimales provenientes de la cresta neural craneal (que dan origen a la papila y el folículo dental). A partir de estas células, derivan las demás estructuras de los órganos dentarios como, la dentina, pulpa, cemento y ligamento periodontal (32).

Las células troncales dentales se consideran una población de *MSC* según lo establecido por la Sociedad Internacional para la Investigación de Células Madre (*ISSCR*) (34). En el año 2000, se empezaron a aislar y caracterizar varias células madre/progenitoras dentales humanas (32), las primeras fueron de tejido de la pulpa dental humana (*hDPSC*), posteriormente fueron células madre de dientes deciduos exfoliados

(*SHED*), células madre del ligamento periodontal (*PDLSC*), células madre de la papila apical (*SCAP*) (38), y células precursoras del folículo dental (*DEPC*) (32). También se ha observado que presentan capacidad inmunosupresora (35), con actividad de adherencia plástica y diferenciación a multilínea (34), ya que dan lugar a al menos tres líneas, el osteo/odontogénico, adipogénico y neurogénico (38). Por otro lado, muestran una expresión positiva de marcadores específicos a antígenos de superficie (34) y están más comprometidas con el desarrollo odontogénico que osteogénico (38).

Algunas ventajas importantes que presentan es su fácil accesibilidad ya que el banco de células madre es una alternativa para llevar a cabo la recolección, adicionalmente, muestran buena interacción con los andamios y tienen alto potencial de proliferación. Por ende el descubrimiento de las células madre dentales ha planteado ser un escenario en la odontología regenerativa (39) ya que la posibilidad de poder utilizar estas células obtenidas directamente de los pacientes nos pone en marcha un futuro esperanzador que permitirá mejorar los tratamientos, convirtiéndolos en parte de los tratamientos de rutina dentro de la práctica dental (39).

2.7. Células troncales pulpares dentales humanas (*hDPSC*)

La pulpa dental es un tejido oral (33) altamente vascularizado, innervado (36) y no mineralizado compuesto por tejido conectivo blando, componentes linfáticos vasculares y elementos nerviosos que ocupan la cavidad pulpar de cada diente (33). Presenta varias funciones, como proporcionar nutrición y responder a señales externas lo cual ayuda a mejorar la sensibilidad neural (36).

En el año 2000 se aislaron por primera vez por Gronthos y colegas, quienes las obtuvieron de terceros molares permanentes humanos (32). Son células troncales derivadas del ectodermo lo que significa que se forman a partir de células de la cresta neural, migran y tienen propiedades de células mesenquimales (33). Además, poseen características clonógenas y altamente proliferativas. Por otro lado, estudios previos confirmaron que las *hDPSC* tienen capacidad de diferenciarse en adipocitos, células neurales y odontoblastos, e incluso en estudios adicionales muestran una diferenciación hacia células similares a osteoblastos, condrocitos y mioblastos (multipotencia) con capacidad de autorrenovación (32).

A pesar de ser una pequeña cantidad de tejido comparado con otras fuentes de célula madre, la pulpa dental presenta una doble ventaja en cuanto a un alto contenido en células madre y un procedimiento menos invasivo para su recolección. Su facilidad de aislamiento y alto potencial de expansión *in vitro* ha hecho que sea muy prometedor para el tratamiento de regeneración de músculo, piel, cartílago, hueso, hígado, dientes, tejido nervioso, adiposo y cardíaco (37).

2.8. Cultivos celulares *in vitro*

Los cultivos celulares *in vitro* son herramientas de investigación para modelar el desarrollo humano y las enfermedades (48). También mantiene y propaga células *in vitro* que proporcionan nutrientes y suplementos adecuados (49). Es el modelo más seleccionado para la comprensión de sistemas de órganos complejos y son compatibles con las herramientas más innovadoras de biología molecular e ingeniería genética (50).

Los experimentos basados en cultivos celulares muestran ventajas, como la posibilidad de controlar tanto el entorno físico-químico como las condiciones fisiológicas de las células, utilizando poblaciones celulares homogéneas y bien caracterizadas; y así evitando el uso de animales (49).

El procedimiento que se realiza para la aplicación y sistema de cultivo celular simple consiste en que las células se recolectan sometiendo el tejido a digestión química, enzimática o mecánica para eliminar la matriz extracelular (MEC). Luego del aislamiento, se diluyen en medios de cultivos y se propagan en recipientes de cultivos estériles. Finalmente el cultivo directo a partir de tejido da las características muy parecidas al órgano original (50).

Se han realizado avances significativos en el cultivo celular, (49) revolucionando las herramientas de cultivo *in vitro* para la investigación biomédica al incluir el proceso de cultivo de células en 3D, esto con la finalidad de recapitular la heterogeneidad celular, la estructura y las funciones de los tejidos primarios (48). Se han propuesto y utilizado varios métodos para mejorar la técnica de cultivo celular, basados en cultivos de gotas colgantes, andamios biopoliméricos, hidrogeles, láminas celulares, etc. (49). Para realizar la caracterización de los cultivos se puede realizar por medio de microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica.

2.9. Microscopía

La microscopía es el estudio de objetos que son demasiados pequeños para ser examinados a simple vista. En el sistema métrico de unidades, los tamaños de estos objetos se expresan en términos de submúltiplos del metro como micrómetro y nanómetro. Cada vez es más importante conocer a detalle la naturaleza física de las superficies de los sólidos. El método clásico para obtener esta información fue la microscopía óptica que aún sigue siendo una técnica para la caracterización de muestras. Sin embargo la resolución de la microscopía tiene sus limitaciones ya que los efectos de difracción de la longitud de onda de orden similar a la de la luz (23). Para resolver estas limitaciones se ha implementado el uso de microscopía electrónica que sustituye el haz de luz por el de electrones como el SEM y microscopía electrónica de transmisión.

2.9.1. Microscopio óptico

El instrumento óptico también llamado microscopio óptico compuesto fue fundamento básico en la microbiología, en la comprensión de los procesos de la vida, y es esencial en todas las ciencias modernas (24).

Los microscopios ópticos de luz se utilizan en la investigación y se presentan en dos formas básicas: el microscopio biológico y el metalúrgico. El biológico requiere una muestra ópticamente transparente, y el microscopio metalúrgico se utiliza para examinar metales y otros materiales que no pueden hacerse lo suficientemente delgados para que sean ópticamente transparentes (25).

El principio de funcionamiento de un microscopio óptico se basa en la propiedad de los materiales que permiten cambiar la dirección de los rayos de luz. Un microscopio consta de dos sistemas: el sistema de iluminación, aquí lo que pasa es que ilumina una muestra para observar la luz transmitida, aquí la luz de la muestra es recolectada por un objetivo, formando una imagen intermedia que es captada por el ocular y retransmitida al ojo del usuario, y en el segundo sistema, que es el de imágenes produce una imagen ampliada de la luz que ha interactuado con la muestra (26).

Los microscopios electrónicos (*SEM*, *TEM*) y los microscopios de fuerza atómica (*AFM*) se convirtieron en herramientas básicas para las ciencias de materiales, metalurgia, etc., por su capacidad de amplificar hasta el nivel atómico, superando en su resolución el régimen nanométrico (24).

2.9.2. Microscopio electrónico de barrido (*SEM*)

Se desarrolló en Nueva Jersey en condiciones de guerra, pero se produjo un mayor desarrollo después de la segunda guerra mundial. Las primeras imágenes se obtuvieron en 1951 y en Canadá en 1958 inició la producción comercial (25). Es un instrumento que realiza imágenes ampliadas que revelan información a escala microscópica sobre el tamaño, la forma, composición, y otras propiedades físicas y químicas de una muestra (27).

Proporciona una resolución de imagen entre 1 y 10 nm, no superando a la *TEM* pero sí al microscopio óptico, con una profundidad de enfoque muy grande. Se utilizan en varios campos como la investigación médica y de materiales, laboratorios de ciencias forenses, etc. (27). La resolución final lograda se controla mediante la optimización de la preparación de la muestra y los parámetros (28).

Esta técnica presenta ventajas como la facilidad para la preparación de muestras ya que no tiene que hacerse delgada en comparación con otras (25). Las muestras no deben presentar más de 1 mm de ancho en al menos una dimensión, aunque esto puede cambiar según la densidad o la porosidad de un tejido en particular (28). Para la fijación, casi siempre, las muestras deben procesarse hasta secarse, las muestras biológicas se tratan con reactivos de reticulación de proteínas y lípidos, como es el glutaraldehído (GA) y tetróxido de osmio (OsO_4) (28). Para la etapa de deshidratación se realiza con un solvente orgánico, como etanol (ETOH) y acetona o secado al punto crítico con dióxido de carbono, la deshidratación con solventes seguida por el secado en el punto crítico (CPD) es el método más frecuente para eliminar el agua de las muestras biológicas para el procesamiento SEM, aunque se pueden usar alternativas químicas (28). Finalmente en la interpretación de la información general sobre las propiedades del espécimen que se puede obtener a partir de las imágenes SEM son: composición estructural, topografía (forma), visualización en tercera dimensión, también otras propiedades a las que se puede acceder son: estructura de los cristales, defectos de cristal y efectos de deformación de cristales; microestructura magnética; campos eléctricos aplicados a la ingeniería de microestructuras; y emisión óptica estimulada por electrones (27).

Las aplicaciones que se le da es que proporciona información topográfica y morfológica sobre la superficie de los sólidos que es necesaria para entender su comportamiento. Por ende es la primera etapa en el estudio de las propiedades de los sólidos (23).

2.10. Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular comprende un aumento en el número de células, es un proceso dinámico equilibrado por la división y la pérdida celulares (51). Requiere la acumulación de biomasa intracelular, como proteínas y lípidos, para producir células hijas y así mismo debe ocurrir la replicación del ADN para transmitir la información genética (52). La capacidad proliferativa de las células es una característica empleada para examinar el estado de las células (51).

El análisis cuantitativo de la proliferación celular es utilizado en varias aplicaciones biológicas, como la detección de fármacos, la producción de productos biológicos y la evaluación de la citotoxicidad. También permite la comprensión de la dinámica de las respuestas celulares a los estímulos extracelulares, como las respuestas inmunitarias, el crecimiento del cáncer y la diferenciación de células madre (51).

Los métodos para evaluar la proliferación celular se pueden clasificar de acuerdo a la complejidad analítica, siendo el enfoque más sencillo el recuento total de las células y el más sofisticado que proporciona un seguimiento del estado y la posición celular a través de imágenes de lapso de tiempo (53). Los ensayos de proliferación convencionales se emplean mediante varias evaluaciones, como son: síntesis de ADN a través de trazadores radiactivos (^3H -timidina); la actividad de las enzimas mitocondriales que reducen las sales de tetrazolio tales como MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) o colorantes

relacionados con productos de formazan; el nivel de antígeno asociado con la proliferación celular; concentraciones de ATP; conteo manual o automático del número de celdas; y duplicación de la población utilizando tintes de rastreo celular (51).

2.10.1 Método (MTT)

Las sales de tetrazolio se describieron por primera vez en 1894. Uno de los ejemplos más comunes de sales de tetrazolio utilizadas en bioensayos es el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (41).

Es una herramienta que se utiliza para medir el número de células metabólicamente activas de las células vivas en ensayos *in vitro* (42,41). Los pasos del ensayo son incubar las células con MTT, extraer los cristales de formazan de las células, disolver el formazan y medir la absorbancia a 570 nm (42).

El ensayo se basa en la reducción enzimática de la sal de tetrazolio de color claro a su formazan de color azul púrpura intenso (41), mediante la deshidrogenasa mitocondrial y se puede cuantificar espectrofotométricamente (42), se usa comúnmente para evaluar la viabilidad y proliferación celular (43). El valor de absorbancia obtenido es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (41,42). La aplicación de un protocolo optimizado permite medir el crecimiento del cultivo y, en general, la actividad enzimática (41).

El rendimiento preciso del ensayo depende de la solubilización completa de las células y el formazan y la estabilidad de la solución coloreada. Entre sus ventajas se encuentran la medición simultánea de múltiples muestras utilizando lectores de placas de 96 pocillos y automatización (43).

2.11. Espectrofotometría de UV-Vis

La espectrofotometría de absorción *UV-Vis* se encarga de medir la atenuación de un haz de luz después de su paso a través de una muestra (54). Se utiliza para el análisis de rutina o investigación (55), para la detección de grupos funcionales, detección de impurezas, análisis cualitativo y cuantitativo (54).

La técnica mide la absorción de radiación de una frecuencia determinada en el rango de longitudes de onda de *UV-Vis* (54). Esta radiación tiene un rango espectral de aproximadamente 190-800 nm lo que permite la detección de muy bajas concentraciones de compuestos y el uso de cantidades de muestras muy pequeñas (56). Las principales partes de un espectrofotómetro son tres, el sistema de iluminación, el sistema monocromador y el sistema de detección (54). Están equipados con lámparas de wolframio y de

hidrógeno o deuterio intercambiables y las anchuras de banda pueden variar de 2 a 8 nm y se han descrito exactitudes en cuanto a las longitudes de onda de ± 0.5 a ± 2 nm (57).

2.11.1. Absorbancia de las soluciones

Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible tienen una aplicación en la determinación cuantitativa de una variedad de especies tanto inorgánicas como orgánicas (57). La absorbancia es la medida de la capacidad de una sustancia de absorber luz de una determinada longitud de onda (54), y ésta no puede medirse en un laboratorio ya que la disolución del analito debe almacenarse en algún recipiente transparente o cubeta (57).

Los instrumentos para medir la absorción de radiación ultravioleta visible están compuestos por: fuentes; selectores de longitud de onda; recipientes para la muestra; detectores de radiación; y procesadores de señal y dispositivos de lectura (57).

2.12. Efecto pro-inflamatorio

La cicatrización de heridas es un proceso que consta de tres etapas: inflamación, proliferación celular y remodelación de tejidos (46). La respuesta inflamatoria es una reacción primordial del organismo ante cualquier tipo de estrés que puede implicar desde una simple lesión hasta una infección compleja (47).

La fase aguda inicial de la respuesta inflamatoria tiene varias facetas que implican la activación sinérgica de las células T y B en paralelo con la inducción hepática de proteínas de fase aguda como la interleucina 1 (IL-1), IL-6 y TNF α . La fase aguda es seguida por un bucle pro-inflamatorio de alimentación que se encuentra en el área de infección o lesión del músculo liso en el que hay extravasación de leucocitos, eritrocitos y componentes plasmáticos en el tejido lesionado (47).

La resolución de la inflamación aguda está impulsada por una estrecha interacción entre las citocinas antiinflamatorias y pro-inflamatorias. Las principales citoquinas antiinflamatorias incluyen IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13, mientras que el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), IL-1, TNF α , gamma-interferón (IFN γ), IL-12, IL-18 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos son citoquinas pro-inflamatorias. La fase aguda se requiere para los efectos fisiológicos de la reparación de tejidos, la respuesta inmune y la resolución de la lesión, si no se controla, esta respuesta pro inflamatoria aguda puede convertirse en inflamación crónica (47).

La inflamación crónica se caracteriza principalmente por la infiltración tisular de linfocitos y macrófagos que establecen un escenario y un sitio para la generación de citocinas pro-inflamatorias. Como consecuencia, hay una producción excesiva y una liberación sostenida de citocinas pro-inflamatorias a la circulación (47).

2.13. Ciclooxygenasa I y Ciclooxygenasa II

La ciclooxygenasa (COX) es la principal enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas a través de la oxidación del ácido araquidónico (58,59). Las prostaglandinas realizan funciones como la homeostasis de órganos como, el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias (58). La ciclooxygenasa tiene dos isoformas principales conocidas como: COX-1 y COX-2 (59).

La COX I actúa en la síntesis de los prostanoides para propósitos fisiológicos implicados en la homeostasis general y regula funciones como la protección de la mucosa gastrointestinal, función renal y activación plaquetaria (58,60). Se encuentra presente en casi todos los tejidos y se manifiesta de manera casi frecuente (59). En la célula la podemos encontrar en el citoplasma o cerca del retículo endoplásmico. Su peso molecular es de 69.05 kD y mide 22 kb aproximadamente (58).

La ciclooxygenasa II (COX II) es considerada patológica (59) y además una enzima inducible en la síntesis de prostaglandinas que participa en la respuesta inflamatoria (61). Se localiza en la región perinuclear y en la membrana nuclear. Puede ser estimulada o inducida en las células e incluidas las relaciones con la respuesta inflamatoria. Su peso molecular es de 69.09 kD y mide aproximadamente 8,3 kb (58). Está relacionada con la presencia de estímulos dañinos (59) ya que está asociada con la etiología del cáncer y desempeña funciones en la tumorigénesis al desencadenar la producción de un microambiente inflamatorio (61).

2.14. β -Actina

La actina es una proteína ubicua, esencial y de las más abundantes en las células eucariotas (66,67). Presenta funciones en actividades celulares como es la contracción muscular (66,67), adhesión celular (66), el mantenimiento de la integridad celular y la motilidad (67). Tiene un peso molecular de 41.736 kD (68).

Existen al menos seis isoformas de actina en vertebrados: cuatro tipos musculares y dos tipos no musculares (65). Las actinas musculares son tejidos específicos y actúan en la contracción muscular. Por otro lado, las dos actinas no musculares, β - y γ -, están expresadas en todos los tipos celulares (68), son casi idénticas entre sí a nivel de aminoácidos, pero presentan funciones intracelulares distintas (66).

La β -actina es la principal isoforma de las actinas citoplasmáticas y se encuentra en la mayoría de las células eucarióticas no musculares (68). Es una proteína estructural del citoesqueleto altamente

conservada asociada con el crecimiento y la migración celulares, ha sido considerada un gen de referencia en células y tejidos durante años (64). Tiene un peso molecular de 42 kD (72).

2.15. Western Blot

La transferencia de Western se dio a conocer en 1979 por Towbin *et al.* Es un método utilizado en laboratorios de investigación a nivel mundial (62) para la detección (44) y cuantificación (45) de proteínas que utiliza sondas basadas en anticuerpos para obtener información específica sobre las proteínas diana de muestras complejas. El *WB* se puede utilizar para obtener información sobre la cantidad, el peso molecular y las modificaciones postraduccionales de las proteínas (44).

Los pasos para realizar el Western Blot son los siguientes, y cada uno de ellos son importantes para obtener datos analizables, confiables y reproducibles; preparación de la muestra; transferencia a membrana; bloqueo; lavado después del bloqueo; incubación de anticuerpos primarios; lavado después de anticuerpos primarios; incubación de anticuerpos secundarios; lavado después de anticuerpos secundarios; y detección y análisis (45). En conclusión, las proteínas nativas o desnaturalizadas se separan mediante electroforesis en gel y luego se transfieren a una membrana de unión a proteínas, después de que un anticuerpo específico detecte una proteína diana (63).

Otras de las aplicaciones que se le da al *WB* es en el estudio de otros aspectos de los análisis de proteínas como son las detecciones de: diferentes isoformas de proteína, interacciones proteína-proteína, interacciones de proteína-ADN, modificaciones postraduccionales, y detección de la localización subcelular de proteínas. También ayuda para el diagnóstico confirmatorio de enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas (63).

3. Antecedentes

Existen grandes y significativos avances en la fabricación de andamios para su aplicación en la ingeniería de tejidos, sin embargo, a pesar de ello, la entrega de nutrientes a tejidos complejos sigue siendo un desafío. Aprovechando las similitudes en la estructura vascular de los tejidos vegetales y animales, se han desarrollado andamios de tejido vegetal descelularizado para su uso en la medicina regenerativa (16).

En este contexto, Modulevsky *et al.*, 2014, realizaron andamios 3D de celulosa derivada de la manzana para el cultivo con células de mamíferos, demostrando ventajas como la simplificación en la producción, un costo reducido y la capacidad de fabricar celulosa de forma específica (18). Por otro lado, Gershlak *et al.*, 2017, utilizaron vegetales como la espinaca y el perejil descelularizados como fuentes de andamios en la ingeniería tejidos perfundibles, demostrando que células endoteliales se pueden cultivar dentro de la vasculatura de estos mismos (16). Así mismo Adamski *et al.*, 2018, descelularizaron hojas de *Ficus hispida* mediante dos métodos: el primero fue utilizando SDS para eliminar la materia celular, y el segundo método consistió en un protocolo que aísla la vasculatura de las hojas e implica el uso de un baño caliente de lejía y sal para descelularizar las hojas y los tallos. Ambos métodos produjeron andamios con propiedades mecánicas adecuadas y un bajo impacto metabólico celular (19). Bajo la misma línea, Lee *et al.*, 2019, descelularizaron vegetales como la manzana, el brócoli, zanahoria, pimiento para la obtención de andamios de celulosa para el cultivo con células madre pluripotentes, demostrando la capacidad de los armazones para respaldar el cultivo *in vitro* de células de mamíferos (17). De igual manera Contessi *et al.*, 2020, utilizaron tres tejidos vegetales (manzana, zanahoria y apio) para su descelularización, estos mostraron propiedades mecánicas y poros interconectados con un tamaño de 100 a 500 μm , un diámetro regular lo que hace que presente características favorables para la regeneración de tejido adiposo, tejido óseo y tendones. Finalmente, es importante mencionar que existen reportes previos de pruebas *in vitro*, donde se demuestra que los tejidos vegetales descelularizados tienen la capacidad para sustentar la adhesión, proliferación y funcionalidad de las células (20).

4. Planteamiento del problema

Existe un aumento en la incidencia de enfermedades que causa la pérdida de tejidos en la cavidad bucal, la enfermedad periodontal es la principal causa de pérdida de dientes y tejidos de soporte. Se reporta con una prevalencia de 45 al 50 % de la población mundial siendo la sexta la enfermedad más común (71).

En la odontología, ha crecido la demanda en cuanto a situaciones de restitución de los tejidos duros y blandos de la cavidad oral (como el periodonto). Hoy en día, pese a que existen tratamientos que favorecen la formación nueva de hueso sano, cemento y la reorientación de las fibras colágenas periodontales como la Regeneración Tisular Guiada (RTG) así como la Regeneración Ósea Guiada (ROG) (utilizada para cubrir defectos óseos causados por diversas etiologías, tales como: patologías óseas periodontales, defectos intraóseos, etc.(14,13) no se brindan para toda la población debido a que en el mercado se encuentran a un precio elevado principalmente, o bien, hay una gran dificultad de acceso a ellos, esto debido a ubicaciones geográficas.

5. Pregunta de investigación

*¿La descelularización del tejido de nopal (*Opuntia ficus-indica*), permite la obtención de andamios de bajo costo con propiedades degradables, no citotóxicos, bioactivos y que no produzcan algún efecto inflamatorio en su interacción con hDPSC?*

6. Justificación

El cultivo 3D, en lugar del bidimensional (2D), ofrece un microambiente más cercano a las condiciones *in vivo*, lo que permite un mejor desarrollo *in vitro* de organoides. Al igual que con otros órganos, existe una creciente necesidad clínica de organoides óseos, que puedan ser sustitutos adecuados de los injertos óseos autólogos menos disponibles, ayudando a la reparación de lesiones óseas críticas o defectos congénitos (17).

Cada vez es más común que las personas busquen nuevas alternativas que permitan mejorar el estado de salud. Por lo cual, es importante identificar e investigar materias primas que por muchos años se han utilizado en México. Un estudio más profundo de estos materiales permitirá identificar potenciales aplicaciones no sólo en la industria de los alimentos, sino en la farmacéutica, en la industria química, en producción animal, entre otras (1).

Es por ello que esta búsqueda de alternativas en el campo de la medicina y la odontología ha obligado a la ciencia a desarrollar nuevos materiales que permitan la regeneración tisular, ya que hay una necesidad urgente de contar con nuevos materiales, que sean provenientes de fuentes renovables y amigables con el medio ambiente (15). Actualmente existen alternativas biocompatibles que son capaces de promover la regeneración de dichos tejidos.

7. Hipótesis de investigación

Los andamios de tejido descelularizado del nopal (*Opuntia ficus-indica*) permite la obtención de andamios degradables, no citotóxicos, bioactivos y no producen efecto inflamatorio en su interacción con *hDPSC*.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

Conocer algunos de los efectos biológicos de los andamios descelularizados de nopal como degradabilidad, proliferación celular, bioactividad y efecto pro-inflamatorio en interacción con *hDPSC*.

8.2. Objetivos específicos

1. Obtener andamios 3D descelularizados del nopal.
2. Caracterizar los andamios descelularizados del nopal.
3. Medir el tiempo y porcentaje de degradación de los andamios.
4. Cultivar y caracterizar las células troncales dentales pulpares humanas.
5. Evaluar la proliferación de las células troncales pulpares dentales humanas sobre el andamio.
6. Identificar el efecto pro-inflamatorio del contacto de las células troncales dentales pulpares humanas con los andamios.
7. Conocer las características morfológicas celulares de la interacción de las células troncales dentales pulpares humanas con los andamios.

9. Diseño de estudio

9.1. Tipo y diseño de estudio

El estudio llevado a cabo fue en el Laboratorio de investigación Interdisciplinario, Área de Nanoestructuras y Biomateriales de la ENES León, UNAM durante el periodo junio 2021- marzo 2022, fue de tipo experimental puro *in vitro*, prospectivo y comparativo, con un muestreo no probabilístico por cuotas. El universo de estudio fueron las células troncales pulpares dentales humanas y los andamios descelularizados de nopal.

La confiabilidad y reproducibilidad de los resultados se llevó a cabo mediante la realización de experimentos por triplicado, obteniendo un total de tres experimentos independientes y una muestra de 9 ($n=9$). Para la validez interna se contó con la presencia de un grupo control positivo, un grupo control negativo y grupo control experimental (blanco).

9.2. Criterios de selección

Tabla 1. Criterios de elegibilidad. Se muestran los criterios de elegibilidad categorizados en criterios de inclusión, exclusión y eliminación con base en las variables.

Inclusión	Exclusión	Eliminación
Platos de cultivo con más del 80 % de confluencia celular.	Muestras de clorénquima del nopal.	Cultivos celulares y andamios contaminados.
Andamios de celulosa del nopal.	Cultivos celulares con más de 15 divisiones.	

9.3. Variables

Tabla 2. Variables. Se muestran las variables de estudio tanto independientes como dependientes con base a los criterios de selección.

Variable	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	
Independiente	Tipo de andamio	Cuantitativa	Es una estructura tridimensional que actúa como sustituto de la matriz extracelular y que permite controlar los estímulos	Se realizó la descelularización del andamio de nopal para evaluar su efecto biológico en cultivo con <i>hDPSC</i> .

			mecánicos que reciben las células.	
Dependiente	Degradación	Cuantitativa Discreta	Es un proceso en el que el tejido de nopal pierde peso y volumen en su estructura.	Se evaluó mediante comparación del peso inicial-peso final de los andamios en solución de PBS y tripsina. También se evalúa mediante absorbancia de las soluciones en <i>UV-VIS</i> a 350 nm.
	Proliferación celular	Cualitativa, politémica	Es el proceso por el cual una célula crece y se divide para producir células hijas.	Se evaluó por medio de ensayo biológico de colorimetría rápida mediante método MTT y se midió la absorbancia mediante espectrofotometría con <i>UV-VIS</i> a 70 nm.
	Efecto pro-inflamatorio	Cualitativa Dicotómica	Es una reacción primordial del organismo ante cualquier tipo de estrés que puede implicar desde una simple lesión hasta una infección compleja.	Se realizó un ensayo de Western Blot para evaluar la presencia de citoquinas inflamatorias en muestras de proteínas tomadas del cultivo de las células sobre los andamios, en donde se observó la presencia de COX I y COX II.

10. Metodología experimental

10.1. Obtención y descelularización del tejido de nopal (*Opuntia Ficus- Indica*)

Para el presente proyecto de investigación se obtuvieron andamios del tejido vegetal de nopal (*Opuntia ficus-indica*), del cual se utilizó, específicamente la porción del parénquima (pulpa) descartando la clorénquima. Inicialmente se cortaron rebanadas de parénquima, con la ayuda de un rallador de mandolina para obtener bloques de 1x1 cm, los cuales se sometieron a un proceso de descelularización empleando una solución de SDS (*ReagentPlus, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania*) al 0.5 %, se preparó una solución madre en relación al peso molecular del SDS, agregando 0.52 g de SDS en 2.5 mL de dH₂O. Posteriormente se diluyeron 50 µL de la solución madre de SDS en 4.95 mL de dH₂O para obtener la concentración deseada en 0.5 %, la cual se vertió en tubos de centrifuga de 15 mL (CAPP) junto con los andamios. La solución de SDS junto con los andamios de nopal se sometió a agitación durante 48 h a 180 rpm. Pasadas 24 h, la agitación se suspendió para someter los andamios a baño ultrasónico durante 5 min a 40 °C, antes de continuar la agitación para completar el ciclo de 48 h, se renovó la solución de SDS al 0.5 %, preparándose como se mencionó anteriormente. A continuación, las estructuras resultantes, se lavaron tres veces con dH₂O para ser incubadas en una solución de CaCl₂ (*Karal, León, México*) a una concentración de 100 mM durante 24 h a TA se lavaron nuevamente tres veces con dH₂O. En este punto se prepararon tanto los andamios descelularizados como los andamios de tejido nativo que corresponden al grupo de estudio y grupo control respectivamente.

Ambos tipos de andamios, se incubaron con penicilina/estreptomicina (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*) + fluconazol al 1 % (*Laboratorios Senosiain, CDMX, México*) durante 3 h a 180 rpm. Finalmente, las muestras se desinfectaron en solución de etanol al 70 % durante 1 h, se lavaron 3 veces en dH₂O estéril, para ser almacenados a -20 °C hasta su uso (Figura 1).

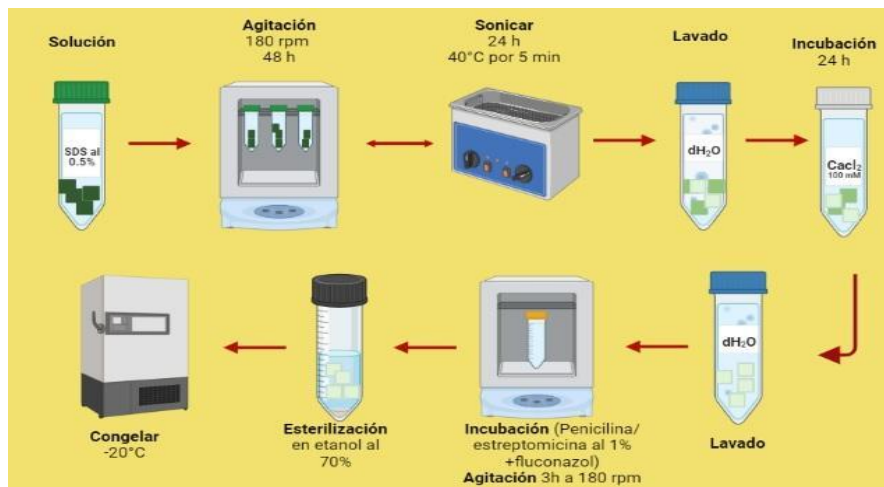


Figura 1. Proceso de descelularización de los andamios de tejido de nopal (*Opuntia Ficus- Indica*).

Fuente: directa, utilizando la página web BioRender.

10.2. Caracterización de andamios descelularizados de nopal

La caracterización de los andamios se realizó por microscopía óptica, con la finalidad de conocer su microestructura y comparar los cambios que la descelularización provoca en esta. Andamios descelularizados y el tejido nativo de parénquima de nopal, fueron fijados en una solución de formaldehído (Karal, León, México) al 2 % y PBS en relación 1:1, durante 24 h y deshidratadas con gradientes de etanol al 25, 50, 75 y 100 %, 5 min en cada uno, posteriormente se colocaron sobre portaobjetos para realizar tinción con safranina y ser observadas al microscopio óptico invertido (Leica DMIL LED). Para SEM (JEOL JSM-IT500), las muestras fueron preparadas como se mencionó anteriormente y se enviaron al Instituto de Geociencias en el campus Juriquilla, para su análisis.

10.3. Degradación enzimática e hidrolítica de los andamios

Para los ensayos de degradación, con la ayuda de una balanza analítica (DENVER INSTRUMENT, Colorado, USA), se midió el peso de todos los andamios antes de ser sometidos al proceso de degradación y se identificó esa cantidad como peso inicial, posteriormente, los andamios descelularizados y de tejido nativo, se colocaron de manera independiente, en tubos de centrifuga de 1.5 mL que contenía una solución de tripsina al 0.5 % y PBS 1X, (Phosphate Buffered Saline 1X) para la degradación enzimática e hidrolítica respectivamente. Los tubos falcon, junto con los andamios y las soluciones, se sometieron a una agitación de 360 rpm a 37.4 °C. Cada 24 h, se detuvo la agitación para extraer los andamios de las soluciones y registrar por un lado, su peso y por otro lado la absorbancia de las soluciones. Este proceso se realizó hasta alcanzar las 240 h. Se tomaron muestras de la solución de PBS (100 µL) y Tripsina (Sigma-Aldrich, 100 µL) en la que se degradaron los andamios, se colocaron en microplacas de 96 pocillos (Corning Costar® de 96 pozos) y se evaluaron en diferentes periodo de tiempo (24,48, 72,96, 168, 192, 216 y 240 h) a 350 nm espectrofotómetro de luz UV-Vis (Thermo fisher scientific, Massachusetts, USA) (Figura 2).

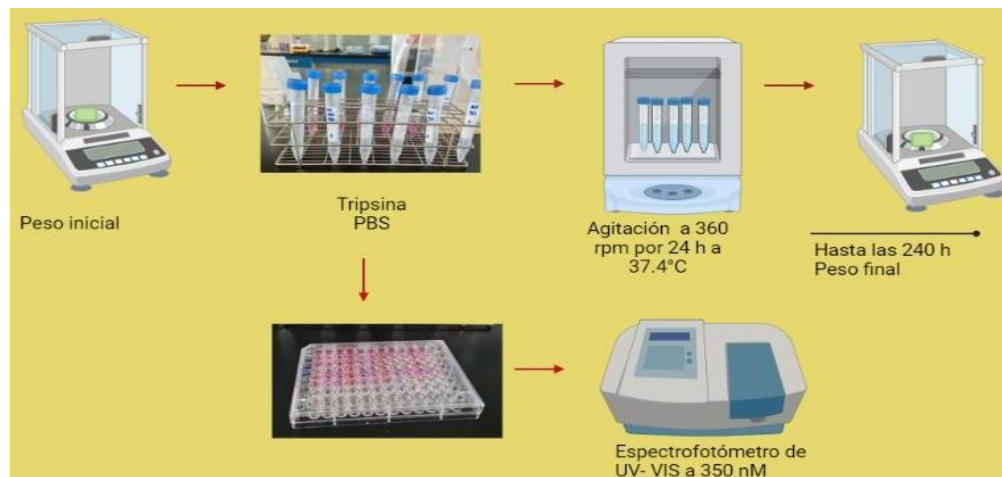


Figura 2. Procedimiento de degradación enzimática e hidrolítica.

Fuente: Directa, utilizando la página web BioRender.

10.4. Subcultivo de células *hDPSC*

Las *hDPSC* fueron obtenidas del banco de células del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Área de Nanoestructuras y Biomateriales de la ENES León, UNAM. De forma inicial, se descongelaron las células que se encontraban en los viales de criopreservación, para lograrlo, cada vial se colocó de 5 a 10 min dentro de la incubadora de células, posteriormente las células se incubaron en platos de cultivo de 3 cm (*Corning®*, Massachusetts, USA) y se agregó 3 mL de medio de cultivo (*MEM*, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) suplementado, se incubó a 37 °C con 5 % de CO₂ realizando cambio de medio cada dos días hasta que se alcanzó una confluencia celular de más del 80 %.

10.5. Inoculación de las *hDPSC* sobre los andamios

Los cultivos de *hDPSC* que presentaron una confluencia mayor al 80 % fueron inoculadas en placas de 24 pocillos (*Corning Costar®* de 24 pozos) junto con los andamios. Como primer paso, se retiró el medio de cultivo del plato donde se encontraban las células, se agregó 0.5 mL de tripsina al 0.5 % para incubar por 5 min a 37 °C. Pasado este tiempo, se corroboró a través de microscopía óptica, que las células se desprendieran del fondo del plato. Se calculó la cantidad de medio que se utilizó para colocar 400 µL en cada pocillo, y se virtió al plato 9.5 mL de MEM suplementado para pipetear con el objetivo de inactivar la tripsina y disgregar las células en el medio, posteriormente se volvió a corroborar esta acción mediante el microscopio óptico (*Leica*, Morrisville, USA). Por último, se colocaron 400 µL de la solución que contiene el medio y las células disgregadas en cada pocillo de la placa de 24 junto con los andamios.

10.6. Proliferación de las *hDPSC* en contacto con los andamios

El ensayo de proliferación celular consistió en evaluar el número de células metabólicamente activas sobre los andamios en un periodo de 240 h. De forma inicial, se subcultivaron las *hDPSC* en placas de 24 pocillos junto con los andamios (como se describió anteriormente en el punto 10.4) a una densidad de 1×10^6 cel/mL y se realizó el ensayo biológico de colorimetría rápida mediante el método MTT (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, USA). Para llevar a cabo este ensayo, se preparó una solución que de bromuro de tetrasodio (sal reactiva de MTT) en medio de cultivo a una concentración de 0.2 mg/mL. Se evaluó la viabilidad cada 24 h hasta los 240 h. Para esto, se retiró el medio de cultivo de los pocillos para los grupos correspondientes al lapso de tiempo a evaluar y se sustituyó con la solución de MTT colocando 400 µL en cada uno para incubar durante un periodo de 4-7 h revisando constantemente las muestras durante este tiempo para corroborar la formación de cristales de formazan, después de transcurrido las 7 h, se retiró la solución de MTT y se colocaron 400 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, USA) para diluir los cristales que se formaron al contacto del bromuro con las células y de estos, se vertieron 100 µL en cada pocillo de la placa de 96, para cuantificar la absorbancia de las soluciones en espectrofotómetro a 570 nm.

10.7. Características morfológicas de las *hDPSC* en contacto con los andamios

Para conocer las características morfológicas de las células sobre el andamio, se utilizó microscopía óptica y *SEM*. Después de 240 h de interacción entre las células y los andamios descelularizados, las muestras fueron preparadas (como se mencionó anteriormente en el punto 10.2) fijándose y deshidratándose para poder montarlas en portaobjetos. Para el microscopio óptico, las muestras recibieron una tinción de violeta cristal (*Saint Louis, USA*) durante 15 min después de su fijación y deshidratación. Para *SEM*, las muestras se enviaron al Instituto de Geociencias en el campus Juriquilla, para su análisis.

10.8. Ensayo pro-inflamatorio

10.8.1. Obtención y cuantificación de proteínas

Se realizó un subcultivo de *hPSC* en una placa de 24 pocillos junto con los andamios los cuales se incubaron durante 14 días realizando el cambio de medio cada 2 días. Cuando se logró un cultivo bien establecido, se indujo un estado pro-inflamatorio agregando interleucina 1 beta humana (*IL-1 β*) (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*) en cada uno de los pozos que contenían las muestras que correspondían al control positivo agregando 2 μ L de *IL-1 β* en 300 μ L de medio de cultivo para lograr una concentración de 3.12 ng/mL para incubar durante 24 h. Completado este tiempo se realizó lisis y extracción de las proteínas mediante Buffer RIPA Lysis (*VWR AMRESCO LIFE SCIENCE, Radnor, USA*), tanto de los cultivos inducidos al estado pro-inflamatorio como para los cultivos del grupo control y control negativo, en este punto, se retiró el medio de cultivo desgastado, lavando las células en 3 ocasiones con PBS, agregando 300 μ L del Buffer RIPA Lysis en cada pocillo para posteriormente raspar el fondo del pocillo con espátula de plástico estéril y posteriormente corroborar en el microscopio óptico el desprendimiento de las células, todo esto bajo refrigeración a 4 °C.

Se colocó el lisado y los andamios en tubos de centrifuga de 1.5 mL y se sonicaron durante 15 s para después ser llevados a centrifugar a 16,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante, se transfirió a nuevos tubos de microcentrifuga y se calculó la cantidad de proteínas mediante el método de Bradford, posteriormente las muestras de proteínas fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso en el ensayo de Western Blot.

10.8.2. Western Blot

10.8.2.1. Preparación de muestras

Para la preparación se tomaron 10 μL de las muestras que contienen las proteínas y se mezcló con 10 μL de buffer de carga (Tabla 3), se centrifugó a 6,000 rpm durante 3 s para concentrar la mezcla que pudiera quedar en las paredes del tubo y se calentaron a 100 °C por 5 min, para terminar de desnaturalizar las proteínas. De esta manera estuvieron lista y disponibles para su carga en los carriles del gel de electroforesis.

10.8.2.2. Electroforesis (EF)

Para la electroforesis se utilizó un sistema de transmisión manual (Mini-PROTEAN Tetra Handscast System *Bio-Rad, Hercules, California, USA*). La preparación del dispositivo para elaboración del gel (SDS-PAGE), incluyó el lavado con etanol al 70 %, de la goma gris y los cristales, así como su sacado, posteriormente, se juntaron los cristales y se colocaron en el dispositivo verde revisando su estabilidad. Se montó la goma en la plataforma y sobre ella los cristales dentro del dispositivo verde, con una pipeta serológica, se agregó etanol para verificar que pasara libremente entre los cristales, que no se derramara, se removió el excedente por decantación con la ayuda de papel absorbente.

Una vez listo el dispositivo para la preparación de los geles de poliacrilamida (*Bio-Rad, Hercules, USA*), se preparan las soluciones, en primer lugar, la del gel separador (Tabla 4) e inmediatamente después su polimerización, se prepara la solución del gel concentrador (Tabla 5). En un tubo de 50 mL, se vertió la solución del gel separador y con una pipeta serológica de 1000 μL se depositó en el espacio que forma la superposición de los cristales, a 5 mm por debajo del borde inferior del peine, cuidando que no formará burbujas, eliminándolas con etanol en caso de tenerlas y se deja polimerizar durante aproximadamente 10 min. Inmediatamente después se prepara y coloca la solución del gel concentrador, sobre el gel separador polimerizado, cuidando que esta llegue hasta el borde superior de los cristales, se eliminan las burbujas que pudieran haberse formado, se coloca el peine de manera gentil para no generar burbujas que interfieran con la forma del gel y se esperan de 10 a 15 min a que complete su polimerización.

Se colocaron los cristales que contenían el gel de poliacrilamida en ambos lados del Gasdek de la cámara de electroforesis, se retiró cuidadosamente el peine y se aspiró para retirar excedentes de poliacrilamida semi polimerizada en los carriles. Se montó el Gasek en la cámara de electroforesis (*Mini-PROTEAN Tetra System, Hercules, USA*) cuidando que coincidieran los polos negativos y positivos con los de la caja, llenándolo con buffer de corrida (Tabla 6) y verificando que no hubiera fugas derrame del buffer, posteriormente se procedió a cargar las muestras ya preparadas como se mencionó anteriormente colocando con una pipeta serológica de 200 μL , 20 μL de las muestras en cada uno de los carriles iniciando por las muestras del grupo control negativo y en seguida las muestras del grupo control positivo 3 carriles para cada grupo, en el carril número uno se colocan 20 μL del marcador de peso molecular (*Bio-Rad, Hercules, USA*) para iniciar la electroforesis a 170 Volts durante 90 min.

10.8.2.3 Transferencia

Pasado el tiempo de la electroforesis, se recuperó el gel con las proteínas para transferirlas a una membrana de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF) mediante electrotransferencia húmeda. Para esto la

membrana se humedece en metanol para activarla, la esponja y el papel filtro en buffer de transferencia (Tabla 7). Se arma el dispositivo de transferencia con una técnica de “sándwich” en un ambiente húmedo que se logra con buffer de transferencia, colocando los siguientes elementos en el siguiente orden: primero el dispositivo bicolor con la parte negra hacia abajo, esponja- papel absorbente- gel- membrana- papel absorbente- esponja (Figura 3). Se colocó el dispositivo con el sándwich en la cámara de EF cuidando que sus polos coincidieran con los de la cámara y esta se llenó con buffer de transferencia hasta el nivel establecido por el fabricante. Se realizó la transferencia de las proteínas contenidas en el gel de EF a una membrana de PVDF, aplicando un campo eléctrico de 70 Volts durante 1 h, colocando congelantes en la cámara para evitar su sobrecalentamiento. Se recuperó y secó la membrana con papel absorbente para garantizar la transferencia, inmediatamente después, se tiñó con Ponceau S durante 5 min para comprobar que la transferencia sea efectiva, para lavar en tres ocasiones por 5 min usando dH₂O procurando eliminar la tinción en su totalidad y poder continuar con el bloqueo e incubación con anticuerpos.

Bloqueo y Lavados: con tijeras se cortó la membrana entre los 60 y 75 KDa en relación al marcador de peso molecular y se bloquearon ambos fragmentos de la membrana, colocándolos en un recipiente y vertiendo 20 mL de solución de bloqueo (Tabla 8). Dejándolo en el agitador de balanceo (*ROCKit Select BioProducts, Dunedin, Nueva Zelanda*) durante 2 h a 4 °C y posteriormente se descartó la solución y se lavó la membrana con PBST al 0.1 % en 2 ocasiones de 5 min y una más de 10 min, quedando lista para su incubación con anticuerpos.



Figura 3. Montaje de transferencia de proteínas.

Fuente: Directa.

10.8.2.4. Incubación del anticuerpo primario y secundario

Se sumergió la parte superior de la membrana en 20 mL de la solución del anticuerpo primario (Tabla 9), anti-COX 1 (*Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA*) o anti-COX 2 (*Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA*) en una concentración de 1:1000 con solución de bloqueo. Como control positivo interno se utilizó el anticuerpo primario de β -actina (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*) a una concentración de 1:1000. Se llevó a agitación durante 2 h a temperatura ambiente u *overnight* a 4 °C, pasado este tiempo se descartó la

solución del anticuerpo primario, se lavó con PBST al 0.1 % en 2 ocasiones de 5 min y una más de 10 min. Luego se sumergió en 20 mL de solución del anticuerpo secundario 1:1000 (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*) (Tabla 10). Se llevó a agitación durante 1.5 h a 4 °C para después retirar la solución y lavarlos como se describió anteriormente.

10.8.2.5. Detección y análisis

La membrana se incubó 5 min en 600 µL de solución quimio luminiscente Clarity max Western ECL substrate (*Bio-Rad, Hercules, USA*) y reveló mediante el uso del scanner C-Digit Blot para analizar las imágenes mediante el software image studio version 4.0.

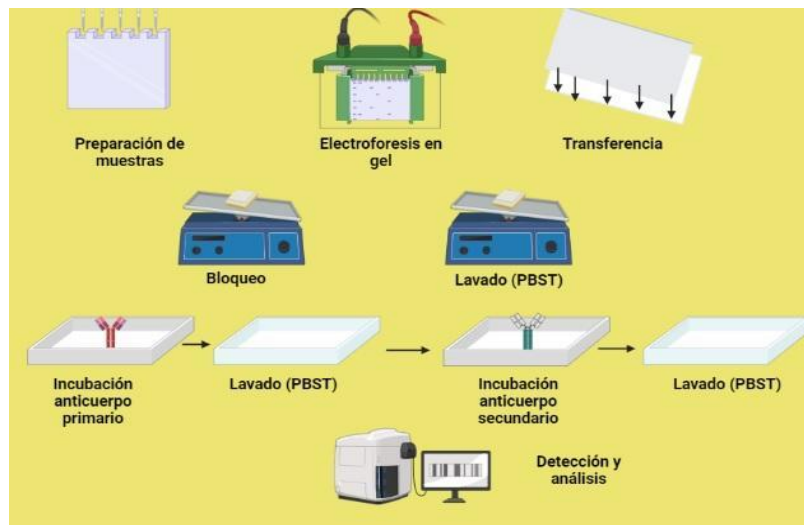


Figura 4. Procedimiento de Western Blot.
Fuente: Directa, utilizando la página web BioRender.

10.9. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos, se determinó el promedio, desviación estándar y porcentaje, así como pruebas de normalidad y t de Student. La significancia estadística fue fijada con un valor $p < 0.05$ y un coeficiente de confiabilidad del 95 %.

11. Resultados

11.1. Descelularización del nopal

Como se mencionó en el apartado de metodología experimental los andamios de 1x1 cm se obtuvieron mediante el uso de una solución de SDS al 0.5 %, este método demostró ser efectivo para aislar la matriz extracelular del nopal después de 48 h, garantizando así la eliminación completa de las células, esto se comprobó inmediatamente, ya que las muestras obtenidas se mostraban incoloras y translúcidas. La descelularización también se corroboró mediante microscopía óptica y *SEM*, donde se compararon las micrografías de las muestras descelularizadas con las muestras de tejido nativo, sin descelularizar. En la microscopía óptica se observaron imágenes que correspondieron a una estructura porosa, con formas circulares interconectadas, positivas para celulosa (Figura 5). En la microscopía electrónica de barrido, las muestras se fijaron, deshidrataron y fueron enviadas para su análisis, la micrografía del tejido nativo, mostró estructuras esféricas, aglomeradas, donde se sugiere que se ubican las células del tejido vegetal, en las muestra de tejido descelularizado, no se observó este abultamiento de las estructuras circulares, en su lugar se observó una estructura porosa que indicó la ausencia de células vegetales, logrando la descelularización y por consiguiente el aislamiento de la matriz extracelular del nopal (Figura 6).

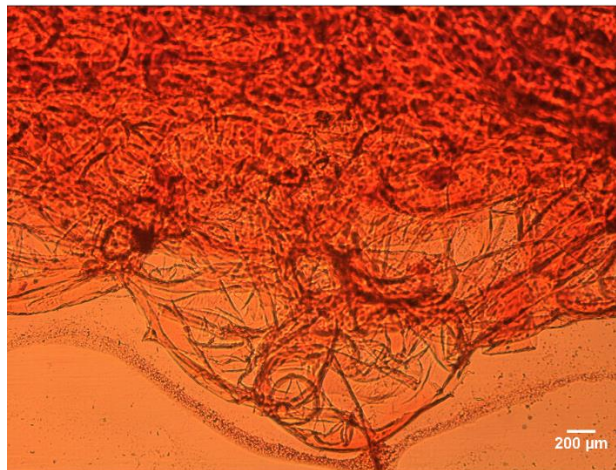
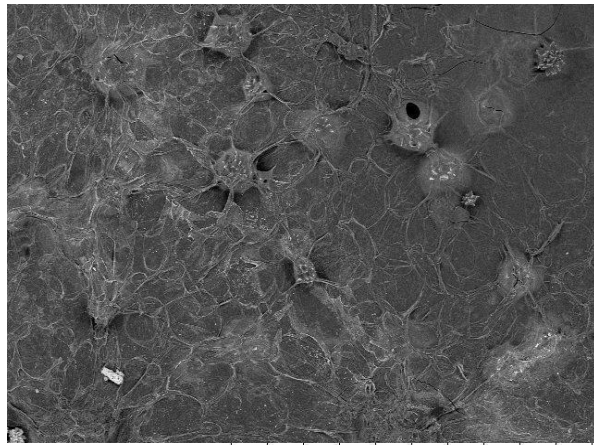
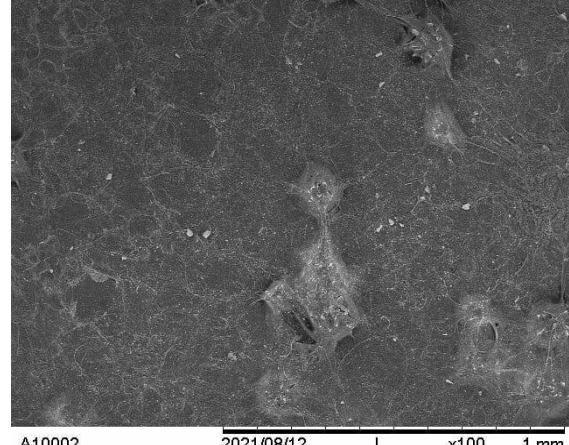


Figura 5. Caracterización del tejido descelularizado de nopal mediante tinción de safranina a microscopía óptica (100X). En la imagen se observan estructuras porosas lo que sugiere que el tejido está descelularizado quedando solo la matriz extracelular.

Fuente: Directa.



A20013
CGEO, UNAM



A10002
CGEO, UNAM

Tejido nativo

Tejido descelularizado

Figura 6. Caracterización de tejido nativo y descelularizado de nopal mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Fuente: Directa.

11.2. Degradación de los andamios

Se evaluó la degradación de los andamios descelularizados y de tejido nativo, mediante la comparación de peso inicial y el peso final, así como la medición de la absorbancia de las soluciones.

En la comparación del peso se identificó como “peso inicial” la primera medición a las 0 h del proceso de degradación y “peso final” aquella medición que se realizó después de 240 h de agitación en las soluciones de tripsina y PBS. Durante el transcurso del ensayo, fue evidente la pérdida de dimensiones de la estructura de los andamios y la medición del peso demostró una disminución gradual en relación con el tiempo registrando una pérdida de peso del 57 % para los andamios descelularizados, en la degradación hidrolítica y un 70 % de pérdida de peso en la degradación enzimática, existiendo una diferencia significativamente estadística ($p < 0.01$) con la degradación de los andamios de tejido nativo ($n=9$). La degradación se evaluó hasta las 240 h, debido a que fue imposible manipular los andamios después de este tiempo por su fragmentación y degradación (Figura 7). En la medición de la absorbancia con espectrofotometría UV-Vis a 350 nm, se presentó un aumento de esta, después de las 96 h, para los grupos de los andamios descelularizados (Figura 8), lo que indica un aumento de su degradación, existiendo una diferencia significativamente estadística con el grupo de los andamios de tejido nativo de nopal ($p < 0.01$, $n=9$).

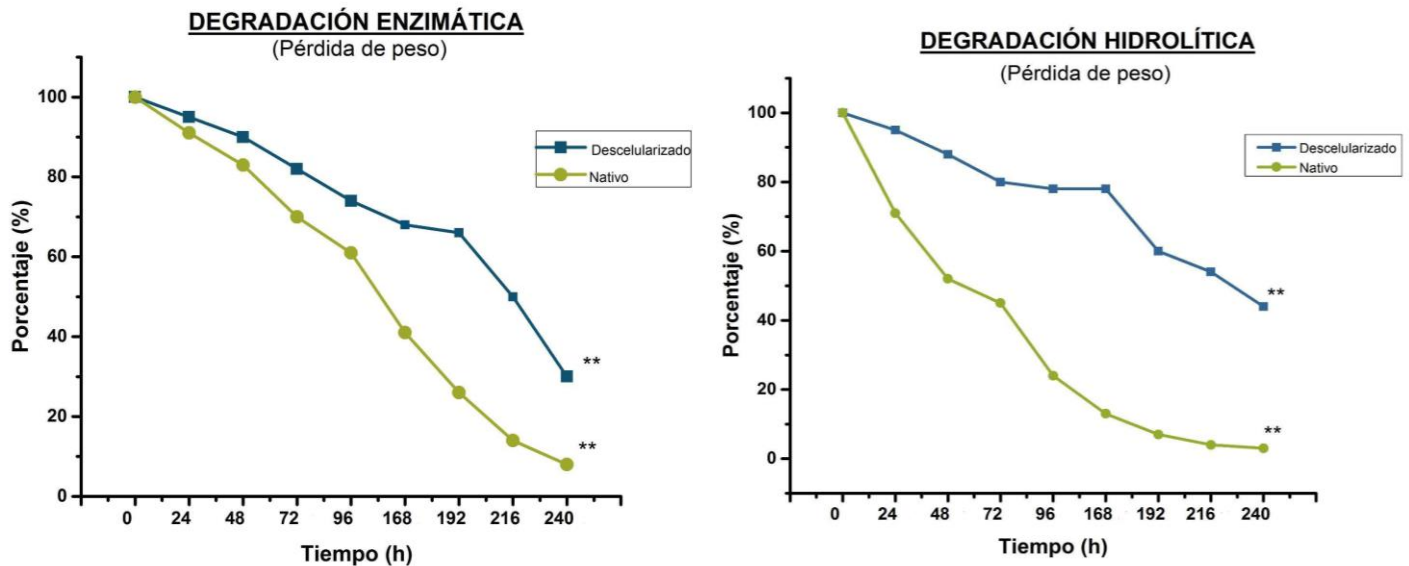


Figura 7. Gráficas de la degradación enzimática e hidrolítica. La gráfica 1 representa el proceso de degradación enzimática es decir la pérdida de peso que tuvieron los andamios descelularizados y nativos al colocarse en solución de tripsina evaluada desde las 0 h hasta las 240 h. En la gráfica 2 se observa de igual manera pérdida de peso pero estas fueron colocadas en PBS, aquí la diferencia entre la línea amarilla y la línea azul es significativa a las 240 h. (** $p < 0.001$, $n=9$, t de Student).

Fuente: Directa.

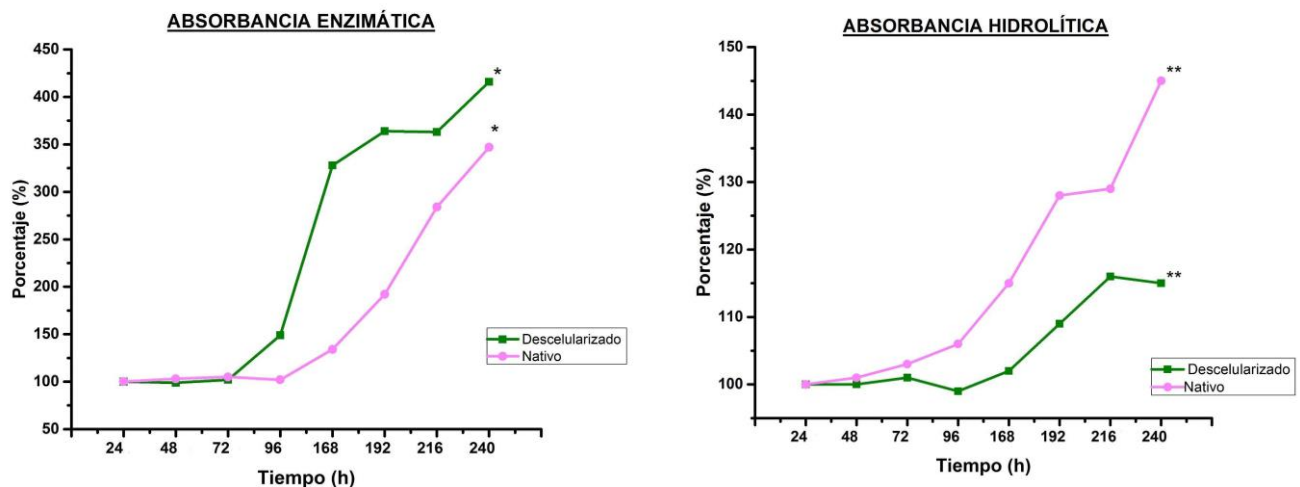


Figura 8. Las gráficas muestran los resultados de la evaluación de la absorbancia a 350 nm para las muestras de los andamios descelularizados y tejido nativo de nopal. La gráfica de la absorbancia enzimática muestra un aumento de los andamios descelularizados. La gráfica de absorbancia hidrolítica muestra un aumento después de las 96 h lo que demuestra su degradación (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, $n=9$, t de Student).

Fuente: Directa.

11.3. Los andamios descelularizados de tejido de nopal, fomenta la proliferación de *hDPSC*

Los andamios descelularizados de tejido de nopal presentan una microestructura óptima para que las *hDPSC* puedan adherirse y proliferar en ella. Para el ensayo de proliferación se subcultivaron *hDPSC* a una densidad de 1×10^6 cel/mL en placas de 24 pocillos, junto con los andamios descelularizados y nativos, se evaluó la viabilidad celular a las 72, 96, 120, 144 y 168 h, mediante ensayo biológico MTT. Se pudo observar, utilizando el microscopio óptico, que las células invaden la superficie de los andamios, estas presentan una viabilidad constante durante las distintas mediciones a lo largo de 120 h. Se identificó una diferencia estadísticamente significativa en la proliferación de las *hDPSC* para los grupos de los andamios descelularizados de nopal, en comparación con el grupo control ($n=9$, $p<0.01$) (Figura 9).

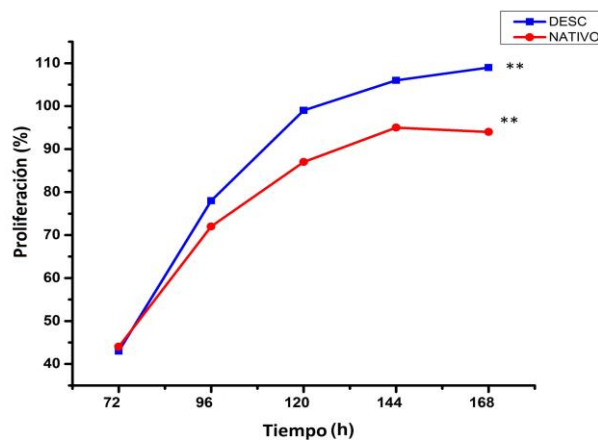


Figura 9. La gráfica muestra la proliferación de *hDPSC* en los andamios descelularizados y tejido nativo de nopal. Donde se destaca una mayor proliferación de *hDPSC* de las muestras descelularizadas, presentando una diferencia estadísticamente significativa a las 168 h (** $p<0.01$, $n=9$, t de Student).

Fuente: Directa.

11.4. Morfología de las *hDPSC* en contacto con los andamios

Para conocer las características morfológicas de las *hDPSC* que invaden el andamio, se empleó microscopía óptica, para esto, las muestras se fijaron, deshidrataron y se incubaron durante 15 min en cristal violeta, las imágenes obtenidas muestran células con forma circular o de esferas sobre el andamio, la comparación con las imágenes de los cultivos 2D en los platos de cultivos solos, donde presentan una morfología fusiforme, alargada y aplanada (Figura 10). De igual manera se prepararon muestras para su caracterización por SEM donde se corroboró los resultados obtenidos con la microscopía óptica, células con morfología circular y esférica sobre los andamios (Figura 11).

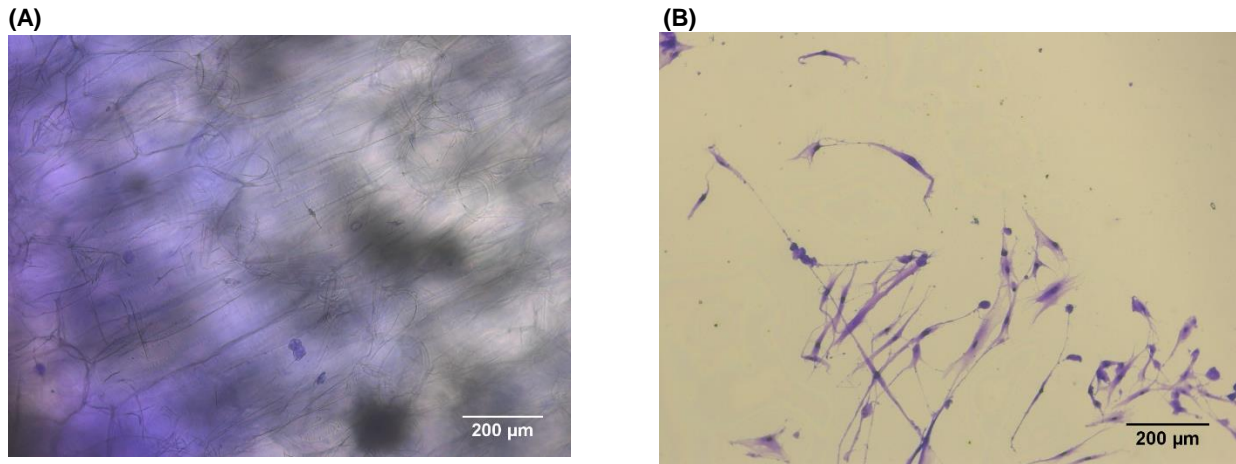


Figura 10. Características morfológicas de las *hDPSC* sobre el andamio de nopal y sin el andamio. En la imagen A) se muestra la morfología esférica de las células sobre el andamio, en comparación con la imagen B) las células sobre el plato de cultivo se muestran alargadas y en forma de huso. Muestras incubadas en cristal violeta llevadas a microscopía óptica (100X).
Fuente: Directa.

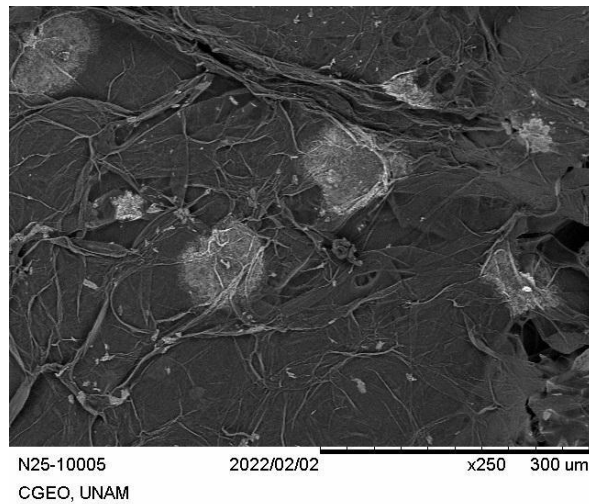


Figura 11. Las imágenes SEM corroboran las características morfológicas de las *hDPSC* sobre el andamio descelularizado de nopal.
Fuente: Directa.

11.5. La expresión de proteínas pro-inflamatorias

En el ensayo de Western Blot se busca demostrar la expresión positiva o negativa de las proteínas pro-inflamatorias COX I y COX II, donde utilizamos β -actina como grupo control (Figura 12). Se puede observar que en el Panel A, que corresponde a las muestras del grupo control negativo, no se observa la expresión

de COX II, a diferencia del Panel B, que corresponden a las muestras de control positivo, donde las células se llevaron a un estado pro-inflamatorio agregando Interleucina 1 β al cultivo, dando como resultado la presencia de bandas que indican la expresión de COX II, lo que indica que la interacción de las *hDPSC* con los andamios descelularizados de nopal no provocan un estado inflamatorio en los cultivos. En la detección de COX II se observan bandas más marcadas en los grupos del control positivo y bandas tenues para las muestras del control negativo.

También se observa la expresión β -actina en todas las muestras, con bandas muy marcadas, lo que demuestra la presencia de proteínas y que todos los carriles del gel de electroforesis fueron cargados con la misma cantidad de proteínas.

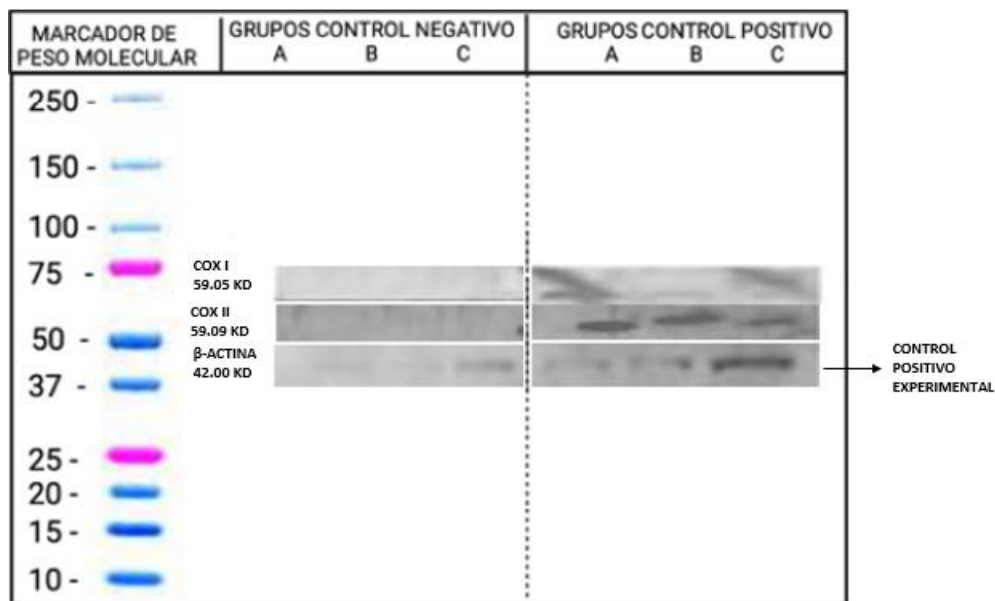


Figura 12. Inmunodetección de COX I, COX II y β -actina mediante Western Blot. En el grupo control negativo las proteínas no se les colocó Interleucina 1 β , en cambio al grupo control positivo las proteínas se llevaron a un estado pro-inflamatorio observándose bandas positivas para COX I, COX II, teniendo como control positivo la β actina.

Fuente: Directa.

12. Discusión

El método de descelularización de tejido vegetal que se describe en este proyecto de investigación, utilizando una solución de SDS al 5 % y agitación, representa un procedimiento seguro, simple, económico, que requiere la menor cantidad de recursos, por consiguiente es amigable con el medio ambiente y ayuda a conservar la matriz extracelular del tejido vegetal (11,21). Lo que hace que sea un método favorable ya que permite la adhesión y proliferación celular en los andamios, la transferencia de nutrientes a través del tejido de nopal y por consiguiente pueda utilizarse en la ingeniería de tejidos.

Con respecto al proceso de degradación, se observó una pérdida de peso de un 70 % en la degradación de los andamios descelularizados, que coincide con lo reportado por Modulesvky et al., 2016, para implantes subcutáneos de andamios descelularizados de tejido vegetal, lo que puede demostrar su posible degradabilidad (69). Es importante este resultado, ya que es una característica que presentan los biomateriales para poder ser utilizados para la regeneración de tejidos y ser aplicados en animales e incluso en el cuerpo humano.

Por otro lado, los ensayos de proliferación de las *hDPSC* realizados en este estudio, demostraron un aumento constante en la viabilidad existiendo una diferencia significativamente estadística entre la proliferación de las *hDPSC* sobre los andamios descelularizados y la proliferación en grupo control, lo cual también se ha observado en reportes previos donde se usan andamios descelularizados de tejido vegetal para el cultivo de distintas células de mamíferos (Modulesvky et al., 2014, Contessi et al., 2020, Gershlak et al., 2019, Lee et al., 2019). Con estos resultados se puede decir que existió una biocompatibilidad de las células con el andamio descelularizado de nopal, ya que se demostró que lograron adherirse, invadir y proliferar dentro de los andamios de celulosa, y con ello se puede decir que este tejido tiene una alta viabilidad incluso después de las 168 h.

Las características morfológicas de las *hDPSC* sobre los andamios descelularizados de nopal que se observaron en las micrografías, muestran células en forma ovalada, circular y esférica a diferencia del cultivo *2D* que son aplanadas y alargadas, es el rasgo que las hace diferentes del cultivo *3D* y estos resultados tienen similitudes con lo ya reportado por otros autores (70). La importancia de la morfología en los cultivos *3D* es que permiten imitar las condiciones y replicar los comportamientos *in vivo*.

Finalmente en la evaluación del efecto pro-inflamatorio de los andamios descelularizados de nopal los resultados que se obtuvieron es que la interacción de las *hDPSC* con los andamios descelularizados de nopal no provocan un estado inflamatorio en los cultivos, estos fueron resultados favorables ya que tiene

una potencial aplicación clínica al no existir rechazo de cuerpo extraño, esto lo podemos comparar con lo reportado por Yi et al. 2020, en el que realizó Western Blot para conocer el efecto anti-inflamatorio por la identificación de expresión de citoquinas como factor de necrosis tumoral α en modelos de cultivos de células mesenquimales.

Dentro del desarrollo de esta investigación, se presentaron ciertas limitantes de estudio, por un lado se observó contaminación en las muestras tanto de los andamios descelularizados, pero sobre todo en las muestras de tejido de nopal nativo, esta contaminación se puede atribuir al método de esterilización de estas muestras que se realizó mediante la aplicación de luz ultravioleta, a la generación natural de endotoxinas y hongos por parte del tejido nativo de nopal o a la presencia de algún microorganismo resistente dentro de la incubadora de células donde se almacenaron muestras para diferentes ensayos, haciendo que se retrasara el experimento ya que se tuvo que desechar estas muestras y volver a repetirlos. Por otro lado, tomó mucho tiempo dominar técnicas complejas como lo es el Western Blot, principalmente al momento de elegir una solución para el lavado de la membrana después del bloqueo y de la incubación con los anticuerpos ya que inicialmente se utilizó TBST al 0.5 % de Tween 20, observándose que las proteínas transferidas a la membrana desaparecían y no se identifican en el proceso de revelado, esto debido probablemente, a la alta concentración del tensioactivo Tween 20, por lo que se decidió cambiar y utilizar PBST al 0.1 %, identificando el lavado, como un paso crítico para aumentar la tasa de éxito en el ensayo, de igual manera se observó que la solución quimio luminiscente utilizada para la detección de las proteínas es muy inestable, con poca duración de acción después de ser preparada, por lo que se recomienda usarla fresca y en una sola ocasión.

Experimentos a futuro

Los andamios de nopal descelularizados presentaron excelentes propiedades para la proliferación de células troncales en su superficie lo que sugiere su probable aplicación en la regeneración de tejidos, por lo que resulta necesario realizar ensayos de diferenciación celular a distintos linajes como osteogénica, adipogénica y condrogénica y de esta manera comprobar su potencial efecto regenerativo. En este punto se implementarían pruebas complementarias como la identificación de expresión de proteínas como: osteocalcina, colágeno, entre otras, mediante Western Blot o PCR, mismas que permitan demostrar la diferenciación celular. También se podrían implementar ensayos para medir los niveles de endotoxinas en las muestras de andamios con células, esto demostraría la seguridad del material para ser aplicado en pruebas en *in vivo*. Para así en un futuro plantear la posibilidad de injertar los andamios en ratones para evaluar sus efectos biológicos *in vivo*, mediante imágenes de microtomografía computarizada e inmunohistoquímica, estas pruebas, proyectarían a los andamios para incluirlos en estudios clínicos controlados aleatorizados.

13. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos la hipótesis planteada en un inicio se acepta de manera total ya que se obtuvieron resultados positivos para los andamios de tejido descelularizados en su interacción con *hDPSC*. La descelularización del tejido del nopal (*Opuntia ficus-indica*) mediante el uso combinado de SDS y agitación, permitió la obtención de un andamio que favoreció la proliferación en cultivos *hDPSC in vitro*. También comprueba sus propiedades degradables mediante el ensayo de degradación y su biocompatibilidad en el ensayo de proliferación y al resultar negativas las pruebas de expresión de proteínas inflamatorias. Con estos resultados se puede afirmar su potencial aplicación como biomaterial en la medicina regenerativa mediante el uso combinado o no de células mesenquimales. Gracias a estas investigaciones innovadoras que se realizan cada vez más en el área odontológica, podemos decir que pueden llegar a resolver nuevas problemáticas que se van presentando en la práctica clínica dando la opción de tener nuevas alternativas como el uso de nuevos biomateriales para poder regenerar tejidos perdidos como el periodonto, siendo estos biomateriales accesibles y de bajo costo en comparación con los ya existentes. Es por ello concluir, que la investigación proporcionó resultados prometedores, pero aún queda información por descubrir que pueda ayudar a futuras investigaciones para que andamios descelularizados de origen vegetal puedan llevarse a la aplicación clínica, también es importante tener esa relación de ciencia-clínica para así seguir innovando en el área médica y buscar los mejores tratamientos para el paciente.

14. Anexos

14.1. Materiales

❖ **Obtención del tejido de nopal**

Parénquima del nopal
Rallador de mandolina
Loseta de cristal

❖ **Descelularización**

SDS al 0.5 %
Placa 24 pocillos
Micropipetas de 1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L
Tubos de 15 mL, 50 mL
Incubadora de agitación
Tina ultrasónica
Agua destilada
CaCl₂
Penicilina/estreptomicina al 1 % + fluconazol
Etanol al 70 %
Ultracongelador de -20 °C

❖ **Preparación de muestras para microscopía**

Glutaraldehído al 2 %
Etanol 25 %, 50 %, 70 % y 100 %

❖ **Tinciones**

Tinción de safranina
Tinción cristal violeta

❖ **Degradación hidrolítica y enzimática**

Tripsina
PBS
Microplacas de 96 pocillos
Espectrofotómetro
Báscula analítica

❖ **Subcultivo celular**

Medio de cultivo (D-mem)
Cultivos celulares hPSCD con una confluencia mayor a 80 %
Tripsina estéril al 5 %
PBS

❖ **Proliferación de hDPSC**

Células *hDPSC* a una densidad de 1×10^6 cel/mL
Andamios
Incubadora de células
Solución de MTT (0.2 mg/mL de bromuro de tetrasodio diluido en medio de cultivo)
Placa de 96 pocillos
Dimetilsulfoxido (DMSO)
Espectrofotómetro.

❖ **Ensayo proinflamatorio**

1) Obtención de muestras

Cultivos de *hDPSC*
Andamios
Rypa de lisis
Espátulas de plástico
Hielo
Contenedor
Interleucina 1 (IL-1) a 3.12 ng/mL
Centrífuga
Tubos de microcentrífugas
Placa de 24 pocillos

2) Cuantificación de proteínas

Albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg/mL
Microplaca de 96 pocillos
Reactivo de Bradford

3) Preparación de muestras

Muestras con proteínas
Centrífuga
Bloque de calor

Tabla 3. Buffer de carga

950 μ L de Laemmli sample buffer 2X (<i>BIORAD</i>) 50 μ L de β -mercaptoethanol

4) Electroforesis en gel (SDS-PAGE)

Cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra System)

Tabla 4. Gel separador

1.6 mL de Agua desionizada
1.3 mL de Tris HCl pH 8.8
2 mL de poliacrilamida al 30 %
50 μ L de SDS 10 %
50 μ L de PSA
5 μ L de TEMED

Tabla 5. Gel concentrador

1.4 mL de Agua desionizada
250 μ L de Tris HCl pH 6.8
330 μ L de poliacrilamida al 30 %
20 μ L de SDS 10 %
20 μ L PSA
2 μ L de TEMED

Tabla 6. Buffer de corrida

Diluir 100 mL de 10X Tris/Glycine/SDS Buffer (*BIO RAD*) en 900 mL de agua desionizada

5) Transferencia

Cámara de electrotransferencia
Papel filtro
Esponja
Membrana de floururo de polivinillidemo (PDFV)
Pinzas
Solución de rojo de Ponceau S
Agua desionizada

Tabla 7. Buffer de transferencia

Diluir 100 mL de 10X Tris/Glycine Buffer (*BIORAD*) en 900 mL de agua desionizada

6) Bloqueo de la membrana

Recipiente de plástico
Agitador

Tabla 8. Solución de bloqueo al 3 %

1.2 gr de Leche descremada
40 mL de PBST 0.1 %
Agitar hasta lograr una mezcla homogénea

7) Incubación con anticuerpo o Inmunodetección

Agitador
Refrigerador 4 °C

Tabla 9. Solución del anticuerpo primario 1:1000

20 mL de solución de bloqueo al 3 %
20 µL de anti-COX1, anti-COX2 o anti β - actina

Tabla 10. Solución del anticuerpo secundario 1:1000

10 mL de solución de bloqueo al 3 %
10 µL de anti-ratón con peroxidasa de rábano picante

Tabla 11. PBST al 0.1 %

500 mL de PBS (pH 7.4)
500 µL de Tween 20

8) Detección

Tabla 12. Solución quimioluminiscente (CIARITY Max Western ECL Substrate BIORAD 1:1)

Mezclar 600 µL de lumino/enhacer solution y 600 µL de Peroxide solution
Se recomienda colocar la solución en la membrana y colocarle kleen pack.

Scanner C- Digit Blot mediante el software image studio versión 4.0.

14.2. Participación en congresos, concursos, talleres.

- ❖ Expositora de la presentación del tema: Andamios descelularizados de nopal (*opuntia-ficus indica*) en cultivos con células troncales pulpares dentales humanas (*hDPSC*) obteniendo el **3er** lugar en la categoría de Licenciatura Investigación Básica en el marco del **XXIX Encuentro Nacional y XX Iberoamericano de Investigación en Odontología**.
- ❖ Participación en la edición 2021 de Industrial Transformation México, Hanoover Meese con el Stand de prototipos en el marco de Futuristic Minds; con el proyecto de regeneración de tejidos con estructuras naturales descelularizadas de manzana y nopal.
- ❖ Colaboradora en la participación del concurso de NanoArtography con la imagen de “Ingrained glochid cells from Nopal”.
- ❖ Participación como emprendedora en el sistema InnovaUNAM.



15. Referencias Bibliográficas

1. Torres-Ponce RL, Morales-Corrales D, Ballinas-Casarrubias M, Nevárez-Moorillón G. *El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal*. Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.6 no.5 [Internet]. 2015 Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-0934201500050018
2. Stintzing FC, Carle R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. Mol Nutr Food Res [Internet]. 2005 [citado el 10 de marzo de 2021];49(2):175–94. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15729672/>
3. Maki-Díaz G, Peña-Valdivia CB, García-Nava R, Arévalo-Galarza ML, Calderón-Zavala G, Anaya-Rosales S. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica*) PARA EXPORTACIÓN Y CONSUMO NACIONAL. Agrociencia (1996) [Internet]. 2015;49(1):31–51. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30236850003>
4. Sabino M, Loaiza M, Dernowsek J, Rezende R, Da Silva J. Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos. Rev. LatinAm. Metal. Mat. [Internet]. 2017, 37(2): 120-146. Disponible en: <http://www.rlmm.org/ojs/index.php/rlmm/article/view/822>.
5. Lopez Senra E. Andamios y biomoléculas de origen marino para regeneración tisular del sistema osteoarticular. Física aplicada; [Internet]. 2020. Disponible en: <http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/handle/11093/1416>
6. León de Ulloa J, López Cruz A, González Ruíz JE, Pérez Rodríguez YV, Ríos Moreno R. Diseño de andamios personalizados para la regeneración de una mandíbula con dimensiones reducidas. Rev cuba investig bioméd [Internet]. 2017 [citado el 10 de marzo de 2021];36(1):1–8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002017000100001&lng=es&tlng=es.
7. Stoppel WL, Ghezzi CE, McNamara SL, Black LD 3rd, Kaplan DL. Clinical applications of naturally derived biopolymer-based scaffolds for regenerative medicine. Ann Biomed Eng [Internet]. 2015 [citado el 13 de abril de 2021];43(3):657–80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25537688/>
8. Adragna, C., Jurczyszyn, S. *Impresión 3D y caracterización de andamios de colágeno extraído de piel porcina para uso biomédico*. UNC. [Internet]. 2018. Disponible en :<https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/6522/Proyecto%20Integrador%20Adragna-Jurczyszyn.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
9. Gupta SK, Mishra NC, Dhasmana A. Decellularization methods for scaffold fabrication. Methods Mol Biol [Internet]. 2018 [citado el 14 de abril de 2021];1577:1–10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28550502/>
10. Blaudez F, Ivanovski S, Hamlet S, Vaquette C. An overview of decellularisation techniques of native tissues and tissue engineered products for bone, ligament and tendon regeneration. Methods [Internet]. 2020 [citado el 14 de abril de 2021];171:28–40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31394166/>
11. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials [Internet]. 2011 [citado el 14 de abril de 2021];32(12):3233–43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21296410/>
12. Pascoe S, Mendoza Michelle. *Producción y Caracterización de Películas de Biopolímero de Nopal Opuntia ficus-indica (L.)* 2019. [citado el 21 de abril de 2021]; Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/331443577_Produccion_y_Caracterizacion_de_Peliculas_de_Biopolimero_de_Nopal_Opuntia_ficus-indica_L

13. Yamazaki M. The chemical modification of chitosan films for improved hemostatic and bioadhesive properties. 2008 [citado el 8 de febrero de 2021]; Disponible en: <https://repository.lib.ncsu.edu/handle/1840.16/3019>
14. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2004;56(10):1467–80. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X04000705>
15. Ovando M. Modificación de biopolímeros extraído de nopal (*Opuntia ficus indica*) y su aplicación para la remoción de metales pesados en agua. IPICYT. [Internet]. 2012 [citado el 16 de junio de 2021]. Disponible en: <https://repositorio.ipicyt.edu.mx///handle/11627/96>.
16. Gershlak JR, Hernandez S, Fontana G, Perreault LR, Hansen KJ, Larson SA, et al. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* [Internet]. 2017 [citado el 16 de junio de 2021];125:13–22. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28222326/>
17. Lee J, Jung H, Park N, Park S-H, Ju JH. Induced osteogenesis in plants decellularized scaffolds. *Sci Rep* [Internet]. 2019 [citado el 16 de junio de 2021];9(1):20194. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31882858/>
18. Modulevsky DJ, Lefebvre C, Haase K, Al-Rekabi Z, Pelling AE. Apple derived cellulose scaffolds for 3D mammalian cell culture. *PLoS One* [Internet]. 2014 [citado el 16 de junio de 2021];9(5):e97835. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24842603/>
19. Adamski M, Fontana G, Gershlak JR, Gaudette GR, Le HD, Murphy WL. Two methods for decellularization of plant tissues for tissue engineering applications. *J Vis Exp* [Internet]. 2018 [citado el 16 de junio de 2021];(135). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29912197/>
20. Contessi Negrini N, Toffoletto N, Farè S, Altomare L. Plant tissues as 3D natural scaffolds for adipose, bone and tendon tissue regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 [citado el 23 de junio de 2021];8:723. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32714912/>
21. Lacombe J, Harris AF, Zenhausern R, Karsunsky S, Zenhausern F. Plant-based scaffolds modify cellular response to drug and radiation exposure compared to standard cell culture models. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 [citado el 23 de junio de 2021];8:932. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32850759/>
22. Harris AF, Lacombe J, Zenhausern F. The emerging role of decellularized plant-based scaffolds as a new biomaterial. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [citado el 23 de junio de 2021];22(22):12347. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34830229/>
23. Skoog D, Holler J, Nieman T. Principios de análisis instrumental. Quinta edición. Mc Graw Hill. 2001
24. Qureshi N, Ordóñez Romero CL, Velázquez Benítez A, Kolokoltsev O. Introducción a la microscopía y nanoscopía a frecuencias GHz y THz. *Mundo Nano Rev Interdiscip Nanociencia Nanotecnología* [Internet]. 2019 [citado el 25 de enero de 2022];13(24):1e–13e. Disponible en: <http://www.mundonano.unam.mx/ojs/index.php/nano/article/view/69620>
25. Egerton R. Physical principles of electron microscopy. SpringerR. 2005
26. Schädler k. Introducción al microscopio óptico, técnicas y aplicaciones de microscopía óptica [Internet]. 2021. News-courier.com. [citado el 25 de enero de 2022]. Disponible en:

<http://www.news-courier.com/tn/articles/an-introduction-to-the-light-microscope-light-microscopy-techniques-and-applications-351924>

27. Goldstein J, Newburry DE, Michael JR, Ritchie N, Scott J, Joy DC. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. Cuarta edición. Springer. 2018
28. Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. Scanning electron microscopy. *Curr Protoc Microbiol* [Internet]. 2012;Chapter 2(1):Unit 2B.2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25>
29. Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue engineering; Current status & futuristic scope. *J Med Life* [Internet]. 2019 [citado el 25 de octubre de 2021];12(3):225–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31666821/>
30. Olson JL, Atala A, Yoo JJ. Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam Med J* [Internet]. 2011 [citado el 25 de octubre de 2021];47(1):1–13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22111050/>
31. Janoušková O. Synthetic polymer scaffolds for soft tissue engineering. *Physiol Res* [Internet]. 2018 [citado el 16 de enero de 2022];67(Suppl 2):S335–48. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30379554/>
32. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2012 [citado el 16 de enero de 2022];56(3):549–61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22835537/>
33. Nuti N, Corallo C, Chan BMF, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent differentiation of human dental pulp stem cells: A literature review. *Stem Cell Rev* [Internet]. 2016 [citado el 21 de enero de 2022];12(5):511–23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27240827/>
34. Bottino MC, Pankajakshan D, Nör JE. Advanced scaffolds for dental pulp and periodontal regeneration. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2017 [citado el 21 de enero de 2022];61(4):689–711. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886764/>
35. Kim RH, Mehrazarin S, Kang MK. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for oral and systemic diseases. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2012 [citado el 21 de enero de 2022];56(3):651–75. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22835544/>
36. Xie Z, Shen Z, Zhan P, Yang J, Huang Q, Huang S, et al. Functional dental pulp regeneration: Basic research and clinical translation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [citado el 02 de febrero de 2022];22(16):8991. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445703/>
37. Di Nardo P, Dhingra S, Singla D. Adult Stem Cells. *Methods and Protocols*. Springer protocols. Human Press. 2017
38. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* [Internet]. 2009 [citado el 02 de febrero de 2022];88(9):792–806. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19767575/>
39. Aly LAA. Stem cells: Sources, and regenerative therapies in dental research and practice. *World J Stem Cells* [Internet]. 2015 [citado el 02 de febrero de 2022];7(7):1047–53. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26328020/>

40. Fontana G, Gershlak J, Adamski M, Lee J-S, Matsumoto S, Le HD, et al. Biofunctionalized plants as diverse biomaterials for human cell culture. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2017 [citado el 02 de febrero de 2022];6(8):1601225. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28319334/>
41. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta Histochem* [Internet]. 2018 [citado el 08 de febrero de 2022];120(4):303–11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29606555/>
42. Young FM, Phungtamdet W, Sanderson BJS. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2005 [citado el 08 de febrero de 2022];19(8):1051–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16125362/>
43. Benov L. Improved formazan dissolution for bacterial MTT assay. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2021 [citado el 13 de febrero de 2022];9(3):e0163721. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34937171/>
44. Najafov A, Hoxhaj G. *Western Blotting Guru*. Academic Press; 1er edition. Elsevier. 2017
45. Yukhananov R, Chimento DP, Marlow LA. Western blot processing optimization: The perfect blot. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2022 [citado el 08 de marzo de 2022];2349:65–80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34718991/>
46. Xiao T, Yan Z, Xiao S, Xia Y. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2020 [citado el 08 de marzo de 2022];11(1):232. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32527289/>
47. Mohan ML, Vasudevan NT, Naga Prasad SV. Proinflammatory cytokines mediate GPCR dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* [Internet]. 2017 [citado el 13 de marzo de 2022];70(2):61–73. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28763371/>
48. Corró C, Novellasdemunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2020 [citado el 13 de marzo de 2022];319(1):C151–65. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32459504/>
49. Caleffi JT, Aal MCE, Gallindo H de OM, Caxali GH, Crulhas BP, Ribeiro AO, et al. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. *Life Sci* [Internet]. 2021 [citado el 13 de marzo de 2022];286(120028):120028. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34627776/>
50. Gaur P, Rajendran Y, Chittur S V. Cell culture techniques in gastrointestinal research: Methods, possibilities and challenges. *Indian J Pathol Microbiol* [Internet]. 2021 [citado el 26 de marzo de 2022];64(Supplement):S52–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34135138/>
51. Chung S, Kim S-H, Seo Y, Kim S-K, Lee JY. Quantitative analysis of cell proliferation by a dye dilution assay: Application to cell lines and cocultures: Simultaneous Proliferation Analysis of Cocultured Cells. *Cytometry A* [Internet]. 2017;91(7):704–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.23105>
52. Zhu J, Thompson CB. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019 [citado el 26 de marzo de 2022];20(7):436–50. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30976106/>
53. Summers HD, Wills JW, Brown MR, Rees P. Poisson-event-based analysis of cell proliferation: Poisson-Event Based Analysis of Cell Proliferation. *Cytometry A* [Internet]. 2015;87(5):385–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22620>

54. Castellanos IC, Velandia JR, González MA, Varela DA, Ramírez E. Aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro UV-VIS UV-1800 de Shimadzu 1a edición / Bogotá: Universidad EAN. 2018
55. Ferreira CP, Techera Antunes FT, Rebelo IN, da Silva CA Junior, Vilanova FN, Corrêa DS, et al. Application of the UV-vis spectrophotometry method for the determination of glutamate in the cerebrospinal fluid of rats. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2020 [citado el 26 de marzo de 2022];186(113290):113290. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32416445/>
56. L.C. Passos M, M.F.S. Saraiva ML. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement (Lond)* [Internet]. 2019;135:896–904. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263224118311904>
57. Skoog D, Holler F, Nieman T. Principios de análisis instrumental. Quinta Edición. Mc Graw Hill. 2001
58. García Meijide JA, Gómez-Reino Carnota JJ. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Rev Esp Reumatol* [Internet]. 2000 [citado el 28 de marzo de 2022];27(1):33–5. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-articulo-fisiopatologia-ciclooxigenasa-1-ciclooxigenasa-2-8546>
59. Goetz Moro M, Vargas Sanchez PK, Lupepsa AC, Baller EM, Nobre Franco GC. Biología de la ciclooxigenasa en la función renal – Revisión de la literatura. *Rev colomb nefrol* [Internet]. 2017 [citado el 28 de marzo de 2022];4(1):27. Disponible en: <https://revistanefrologia.org/index.php/rcn/article/view/263>
60. Gómez-Luque A. Inhibidores de la COX ¿hacia dónde vamos? *Rev Soc Esp Dolor* [Internet]. 2005 [citado el 28 de marzo de 2022];12(6):321–5. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-80462005000600001
61. Ji X-K, Madhurapantula SV, He G, Wang K-Y, Song C-H, Zhang J-Y, et al. Genetic variant of cyclooxygenase-2 in gastric cancer: More inflammation and susceptibility. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2021 [citado el 28 de marzo de 2022];27(28):4653–66. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34366627/>
62. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [citado el 28 de marzo de 2022];2014:361590. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24738055/>
63. Meftahi GH, Bahari Z, Zarei Mahmoudabadi A, Iman M, Jangravi Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochem Mol Biol Educ* [Internet]. 2021 [citado el 28 de marzo de 2022];49(4):509–17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33847452/>
64. Gu Y, Tang S, Wang Z, Cai L, Lian H, Shen Y, et al. A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of β -actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered* [Internet]. 2021 [citado el 01 de marzo de 2022];12(1):6166–85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34486492/>
65. Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985 [citado el 01 de marzo de 2022];82(18):6133–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2994062/>
66. Chen L, Kashina A. Quantification of intracellular N-terminal β -actin arginylation. *Sci Rep* [Internet]. 2019 [citado el 01 de marzo de 2022];9(1):16669. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31723207/>

67. Varland S, Vandekerckhove J, Drazic A. Actin post-translational modifications: The Cinderella of cytoskeletal control. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2019 [citado el 01 de marzo de 2022];44(6):502–16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30611609/>
68. Blanco O, García M, Costa I, Escriche E. El citoesqueleto de actina: Una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. [Internet]. 2002 [citado el 01 de marzo de 2022]; 21(2), 115-122. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403002002000200009&lng=es&tlng=es
69. Modulevsky DJ, Cuerrier CM, Pelling AE. Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials. *PLoS One* [Internet]. 2016 [citado el 18 de marzo de 2022];11(6):e0157894. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27328066/>
70. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)* [Internet]. 2017 [citado el 01 de marzo de 2022];32(4):266–77. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28615311/>
71. Sanz M, Del Castillo AM, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D’Aiuto F, Bouchard P, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases. Consensus report. *Glob Heart* [Internet]. 2020 [citado el 30 de enero de 2022];15(1):1. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32489774/>
72. Beta Actin - What’s so special about it? [Internet]. St John’s Laboratory Ltd. [citado el 18 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://stjohnslabs.com/beta-actin-whats-so-special-about-it/>