

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**PENETRACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE
TEJIDO ADIPOSO EN GELES DE MATRIZ EXTRACELULAR
ÓSEA BOVINA Y DE VEJIGA PORCINA**

No. registro 2020-4

TESIS QUE PRESENTA:

ANACAREN VELÁZQUEZ SOLANO

PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ROSALÍO RAMOS PAYÁN

DR. JOSÉ GEOVANNI ROMERO QUINTANA

CULIACÁN, SINALOA, ENERO 2020

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Jesús Velázquez Beltrán y Margarita Solano Zazueta porque todo lo que soy ha sido gracias a su amor, dedicación, paciencia y educación, gracias por apoyarme en cada una de mis metas, por ayudarme y no dejarme sola en ningún momento.

A mis hermanas Kady Gabriela Velázquez Solano, Natiely Anay Velázquez Solano y Paola Margarita Velázquez Solano quienes hicieron posible cumplir este sueño, gracias por ser mis amigas, compañeras de vida y por estar a mi lado siempre, por ser el brillo en mi vida, por inspirarme y contagiarme con su felicidad.

A mi familia en especial a mi abuela Florencia Zazueta y a mis tías Eliza e Icela así como también mis tíos de la criba "Solza" gracias por creer en mí, por ayudarme a cumplir mis sueños, por estar ahí en cada uno de los momentos complicados y ayudarme a salir adelante.

A mi prima Elizabeth Peñuelas Solano y a su esposo Daniel Pérez Parra por darme aliento y apoyo, y brindarme su mano en momentos difíciles como también en momentos de alegría.

A mis dos estrellas que me iluminan desde el cielo Margarita Solano Zazueta y Everardo Solano Urías siempre serán un ejemplo a seguir, los llevo en mi corazón.

A mi familia y amigos por hacer de mis sueños sus sueños y mis metas sus metas, no me alcanzara la vida para devolverles todo lo que han hecho por mí.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar por permitirme formar parte de esta gran familia que se ha vuelto la especialidad en Endodoncia, gracias por guiarme siempre de la mejor manera y demostrarme que es importante vivir sonriendo.

Al plantel docente tanto teórico como clínico, gracias por compartir sus conocimientos, por exigirme tanto, por no permitirme quedarme atrás, por darme su regaño cuando fue necesario y sus manos cuando más lo necesite.

Gracias al Dr. Alfredo Ayala Ham quien siempre fue un pilar importante en esta misión, gracias por sus enseñanzas como maestro, jefe, amigo y colega. Por creer en mí en los momentos más difíciles.

Gracias a la gran familia del Laboratorio de Microbiología en especial a German Jiménez y a Jorge López, por su apoyo y paciencia durante mis estadías en el laboratorio para la elaboración de mi estudio de investigación. A todos los alumnos y personas que comprenden el grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Molecular e Inmunología.

ÍNDICE

Índice de Tablas.....	VI
Índice de Figuras.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
Introducción.....	IX
1 Marco Teórico.....	4
1.1 Tejido Óseo.....	4
1.1.1 Daño Óseo.....	5
1.2 Regeneración Ósea.....	6
1.2.1 Mecanismos de Regeneración Tisular.....	7
1.2.1.1 Respuesta inflamatoria aguda.....	8
1.2.1.2 Reclutamiento de células troncales mesenquimales.....	9
1.2.1.3 Generación de un callo cartilaginoso y óseo.....	10
1.2.1.4 Revascularización y neoangeogénesis en el sitio de la lesión.....	10
1.2.1.5 Mineralización y reabsorción del callo cartilaginoso.....	11
1.2.1.6 Remodelación ósea.....	12
1.3 Biomateriales En Regeneración Ósea.....	13
1.3.1 Matriz Extracelular.....	15
1.3.1.1 Matriz Extracelular de Vejiga Urinaria (MEC VU).....	18
1.3.1.2 Matriz Extracelular Ósea Bovina.....	22
1.3.1.3 Hidrogeles derivados de matriz extracelular descelularizada.....	23

1.4	Células Troncales Mesenquimales	26
1.4.1	Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo.....	27
1.5	Antecedentes	31
2	Justificación.....	34
3	Objetivos	35
3.1	Objetivo General	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	Diseño de Investigación	36
4.1	Tipos de Estudio	36
4.2	Material Biológico.....	36
4.2.1	Hidrogel de Matriz Extracelular de Vejiga Urinaria (MEC-VU) y Ósea Bovina (MEC OB).....	36
4.2.2	Células Troncales Mesenquimales	36
4.3	Localización	37
4.4	Diseño Experimental.....	38
4.4.1	Ensayos de penetración de las MSCs sobre los hidrogeles	38
4.4.2	Procedimiento de tinción H&E	42
5	Resultados	44
5.1	Observación en fresco de la colonización y penetración celular en la mec	44
5.2	Cortes Histológicos teñidos con H&E.....	46
6	Discusión.....	49
7	Conclusión	54
8	Bibliografía	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación fuentes de obtención de células madre mesenquimales.....	30
Tabla 2. Caja de cultivo de 24 pozos.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inflamación aguda. Tomada de Romo (21). Proceso de quimiotaxis ocasionado por inflamación aguda.....	9
Figura 2. Cultivo de MSCs de tejido adiposo.....	37
Figura 3. Caja de cultivo con hidrogel y medio estándar. A) distribución de los grupos en la placa de cultivo. B) observación de los hidrogeles con medio de cultivo desde una vista lateral.	40
Figura 4. Determinación de concentración y viabilidad celular. Cámara de Neubauer y tinción con colorante de exclusión de vitalidad azul de tripano.	41
Figura 5. Obtención y procesamiento de la muestra. A) Remoción de hidrogel del pozo de cultivo, B) Obtención de la muestra del hidrogel fuera del pozo, C) Muestra de hidrogel con corte transversal, D) Hidrogel en molde de aluminio con poly-freeze, E) Congelación de la muestra sobre nitrógeno líquido, F) Cortes de 90µm en Crióstato, G) Tinción de la muestra con H&E.....	43
Figura 6. Observación en fresco del hidrogel al microscopio óptico.....	44
Figura 7. MSC-AD en contacto con hidrogeles de MEC-OB a los 7 días observadas al microscopio óptico de campo claro. A) MEC-OB superficie a 4X, B) MEC-OB corte transversal a 10X,	45
Figura 8. MSC-AD en contacto con hidrogeles de MEC-VU a los 7 días observados al microscopio óptico de campo claro. A) MEC-VU superficie a 4X, B) MEC-VU corte transversal a 10X.	46
Figura 9. Corte histológico del hidrogel de MEC-OB teñido con H&E a los 7 días de cultivo a 10X. Medición de capacidad de penetración de MSCs en hidrogel de MEC-OB a los 7 días de cultivo.	47
Figura 10. Corte histológico del hidrogel de MEC-VU teñido con H&E a los 7 días de cultivo a 10X. Gran profundidad de penetración de las MSC-AD sobre el hidrogel de MEC-VU.....	48

RESUMEN

Introducción: La ingeniería de tejidos tiene el objetivo de inducir regeneración tisular funcional a través de la combinación sinérgica de andamios, células y factores de crecimiento. Los andamios son estructuras tridimensionales que permiten la colonización de diversos tipos celulares, su proliferación y diferenciación; estos deben permitir la penetración celular y crear condiciones adecuadas para la formación de tejido nuevo. Entre las distintas fuentes de obtención de andamios, estos se pueden elaborar a partir de matriz extracelular (MEC), la cual está constituida por una mezcla de proteínas que crean poros proporcionando espacio y sostén para la célula.

Objetivo: Determinar si las células troncales mesenquimales de tejido adiposo (MSC-AD) tienen la capacidad de penetrar hidrogeles de MEC. **Materiales y métodos:** La MEC ósea bovina (MEC OB) y MEC de vejiga urinaria (MEC-VU) se sintetizó de acuerdo a Sawkins en 2013. Los geles se colocaron en placas de 24 pozos con medio DMEM, y se colocaron 25,000 MSC-AD en la superficie del gel. La penetración se evaluó mediante cortes histológicos teñidos con H&E. **Resultados:** Las MSCs se adhirieron a la superficie del hidrogel y una parte de las ellas logró penetrar hasta una profundidad aproximada de 500 μ m en el hidrogel de MEC-VU y 200 μ m en el de MEC-OB aproximadamente. Además, dentro del hidrogel, las células mostraron una morfología fibroblástica. **Conclusión:** Las MSC-AD son capaces de adherirse, proliferar y penetrar los hidrogeles MEC VU y MEC OB.

Palabras Clave: Células mesenquimales, Matriz extracelular de vejiga urinaria, Matriz extracelular ósea bovina, Regeneración ósea, Hidrogeles.

ABSTRACT

Introduction: Tissue engineering emerge with the objective of inducing functional tissue regeneration through the synergistic combination of scaffolds, cells and growth factors (GF). Scaffolds are three-dimensional structures that allow the colonization of various cell types, their proliferation and differentiation. Among the different sources of scaffolding, these materials can be made from extracellular matrix (ECM), the quality is constituted by a mixture of proteins that create pores and space controls and support for the cell. Scaffolds in regeneration are one of the most relevant factors, they must allow cell penetration and create adequate conditions for the formation of new tissue.

Objective: Determine if mesenchymal stem cells were able to penetrate into extracellular matrix hydrogels. **Materials and Methods:** The ECM of Bovine Bone (ECM-BB) and ECM of Urinary Bladder (ECM-UB) were used according to Sawkins in 2013. The gels were placed in 24-well plates with DMEM culture medium, and 25,000 MSCs were placed on the surface of the hydrogel. Penetration was evaluated by histological sections stained with H&E. **Results:** The MSCs adhered to the surface of the hydrogel and a part of them managed to penetrate to a depth of approximately of 500 μm on MEC-VU and 200 μm on MEC-OB. Also within the hydrogel, they exhibited fibroblastic morphology, characteristic of these cells. **Conclusion:** MSC-ADs are able to adhere, proliferate and penetrate the MEC VU and MEC OB hydrogels.

Key Words: Mesenchymal Stem Cells, Urinary Bladder Extracellular Matrix, Bovine Bone Extracellular Matrix, Bone Regeneration, Hydrogels

INTRODUCCIÓN

Una de las principales demandas de sustitutos biológicos para la regeneración tisular ósea se debe a daños dados por enfermedades degenerativas, traumatismos, exposición a sustancias tóxicas, entre otros. Durante los últimos años se ha estimado que el objetivo principal de las investigaciones para la regeneración de tejidos ha sido encontrar un material ideal para sustituir el tejido óseo. A pesar de que el cuerpo presenta propiedades de reparación, existen situaciones en las que la gravedad de la lesión no permite que estas células logren una regeneración completa. Los médicos han utilizado y popularizado varios sustitutos de hueso para la reconstrucción de defectos óseos (1).

Un aspecto importante de la ingeniería tisular es el desarrollo de biomateriales que puedan promover procesos regenerativos permitiendo la penetración, proliferación y diferenciación de las células, así como proporcionar andamios estructurales que confieran suficientes propiedades mecánicas a los tejidos. El biomaterial debe degradarse a un rango de tiempo comparable al crecimiento de tejido nuevo en el sitio de implantación (2).

Hasta el momento, se han producido desarrollos notables en las técnicas de injerto óseo y materiales de sustitución ósea que se utilizan para el tratamiento de los defectos óseos. La matriz ósea desmineralizada (MOD), fabricada mediante la eliminación de células y de minerales del hueso, es un tipo de xenoinjerto óseo que está compuesto de materiales orgánicos, que incluyen colágeno y factores de crecimiento entre los que destacan la proteínas morfogénicas óseas (3). Estos materiales son estructuras

tridimensionales bioactivas, biodegradables y biocompatibles, altamente porosas con propiedades mecánicas apropiadas para la regeneración de tejido óseo (4). Estos materiales pueden ser osteoconductivos, es decir sirven como andamio para el crecimiento interno de capilares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras (5).

Se ha demostrado que las MSCs tienen capacidad de regenerar tejidos dañados como hueso, tejido hepático, cartílago o miocardio (6). En un estudio realizado por Friedenstein, las células madre fueron aisladas de la médula ósea caracterizadas y descritas como células adherentes al plástico, con una morfología fibroblastoide, y con capacidad de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como adipocitos, osteocitos y condrocitos (7). En un estudio *in-vivo* realizado en ratones y en caninos con defectos cráneo-faciales y defectos de huesos largos con administración directa de células mesenquimales con andamios naturales o sintéticos se observó que la principal aplicación clínica de las MSCs está relacionada con la reparación de tejido óseo (8).

A medida que la ingeniería de tejidos evoluciona, muchos biomateriales han sido evaluados durante la búsqueda de la matriz ideal para la reconstrucción tisular. Un material biocompatible es capaz de mantener la viabilidad celular, permitir la proliferación celular y la expresión del fenotipo en el sitio del injerto, con una densidad estructural para permitir el aumento en el volumen del tejido que constituiría un avance importante para el injerto óseo (9). Una nueva forma de desarrollar bioandamios con mayor estimulación celular, es con la incorporación de MSCs, las cuales pueden secretar moléculas bioactivas dentro de la matriz para lograr la regeneración del tejido dañado.

La ingeniería tisular propone un nuevo enfoque terapéutico que implica la reconstrucción y devolver la función del tejido. Sin duda este es un nuevo campo en la medicina, así como en la odontología y áreas especializadas que agrupa ciencias básicas tales como: biología celular, biología molecular, fisiología, inmunología, bioquímica, ciencias de los materiales y biofísica. Ésta ofrece a los pacientes una alternativa de tratamiento enfocado a regeneración tisular en vez de la cicatrización o el empleo de estructuras no biodegradables y/o rígidas. Es de vital importancia la recuperación completa del tejido óseo en dichos tratamientos, así como el conocimiento de las propiedades mecánicas de los tejidos duros que desean restablecerse y proporcionar microambientes únicos para cada tipo de tejido. La complejidad de la arquitectura y función ósea ofrece retos para el remplazo de tejidos por ingeniería. En nuestro trabajo de investigación nos centraremos en la regeneración de tejido óseo, por ello es necesario conocer su estructura y los elementos que lo conforman.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo denso mineralizado lo que le proporciona una gran dureza, sirve como un tejido y un sistema de órganos dentro de los vertebrados superiores (10). Está constituido por cuatro tipos de células osteoblastos, células de revestimiento óseo, osteocitos y osteoclastos y su matriz contiene un componente orgánico e inorgánico. Morfológicamente, presenta ciertas similitudes al tejido cartilaginoso ya que ambos están contruidos por células rodeadas por una MEC amorfa y se caracteriza por ser esponjoso (esponjoso, trabecular) o cortical (compacto). Las células del hueso, denominadas osteocitos, están localizadas en unos espacios del tejido óseo denominados osteoplastos. Sus funciones principales incluyen la protección de los tejidos blandos, el soporte, la locomoción, el almacenamiento de calcio y fosfato, y el almacenamiento de la medula ósea (11). Aunque el hueso tiene una apariencia inerte, es un órgano altamente activo que se encuentra en constante reabsorción mediada por osteoclastos y neoforado por osteoblastos. Actualmente se ha comprobado que los osteocitos actúan como mecanosensores y en conjunto en el proceso de remodelación ósea (12, 13).

Existen dos tipos de tejido óseo atendiendo a sus características macroscópicas: compacto y esponjoso (o laminar). El tejido óseo compacto está formado por una masa compacta con pocos espacios y en su interior se forma una cavidad que alberga a la médula ósea amarilla. Mientras que el tejido esponjoso está constituido por finas

trabéculas que se entrecruzan dando lugar a una forma de red, cuyos espacios están intercomunicados y albergan la médula ósea roja (10).

Actualmente existen numerosos factores y/o enfermedades que pueden resultar en la pérdida de tejido óseo entre ellas se destacan la osteoartritis, osteomielitis, una dieta limitante de vitamina D, embarazos, accidentes y enfermedades o infecciones crónicas.

1.1.1 Daño Óseo

La pérdida de tejido constituye uno de los problemas de salud más frecuentes y de alto costo a nivel mundial. A pesar del desarrollo tecnológico creciente para la elaboración de sustitutos sintéticos de hueso, estos no han cumplido con las demandas de función y calidad necesarias para lograr la regeneración eficiente de los tejidos.

Existen tratamientos odontológicos que provocan una gran pérdida de tejido óseo como son cirugías de terceros molares, extirpación de quistes y tumores orales, enfermedades periodontales e infecciones pulpares extensas. En el caso de las infecciones pulpares a pesar de los tratamientos endodónticos en algunos casos la patología periapical persiste, por lo que es necesario realizar una cirugía periapical (14). Dichas patologías en conjunto con cirugía apical causan un gran defecto periapical, el cual es definido como un defecto óseo localizado y caracterizado por la ausencia de hueso alveolar a lo largo de la longitud radicular (15).

Actualmente se comprende mejor el proceso de las resorciones óseas mediante la publicación de estudios sobre investigaciones relevantes enfocadas especialmente en la osteoporosis. El proceso de resorción es iniciado por la exhausta proliferación de

precursores de osteoclastos, su diferenciación en osteoclastos, seguido por el proceso de degradación de la matriz ósea. Principalmente, la matriz inorgánica se disuelve mediante la acidificación (HCl) del entorno extracelular, lo que provoca una disminución del pH. Después de esto, la catepsina K, una proteasa lisosómica, degrada el componente orgánico. Los subproductos de este proceso se transportan al lado opuesto del osteoclasto donde se liberan. Después de la degradación de la matriz ósea, se deja una "laguna reabsorbente". El osteoclasto se desprenderá del sitio y pasará potencialmente a un nuevo sitio de reabsorción. Posteriormente, los osteoblastos entrarán en el área y reemplazarán el hueso reabsorbido (10, 16).

1.2 REGENERACIÓN ÓSEA

La regeneración ósea es posible de obtener mediante la combinación de tres elementos: células viables, MEC y sustancias reguladoras insolubles (factores de crecimiento); sin dejar de mencionar factores locales que también son influyentes, como el entorno mecánico y vascular. La combinación de estos elementos genera un ambiente apropiado para la regeneración. Los mecanismos biológicos que proporciona una base para la regeneración son: la osteoconducción que se produce cuando el material de injerto óseo sirve como andamio para el crecimiento de hueso que se perpetúa en el hueso nativo. Los osteoblastos desde el margen del defecto utilizan el material del injerto óseo como osteoconductor; la osteoinducción que consiste en la estimulación de las células osteoprogenitoras de diferenciarse en osteoblastos, para la formación de hueso nuevo. El tipo más estudiado de los mediadores celulares osteoinductivos son la proteína morfogénica ósea (BMPs); la osteopromoción que

implica la mejora de la osteoinducción sin la posesión de la propiedad osteoinductiva, por ejemplo, el esmalte derivado de matriz ha demostrado mejorar el efecto osteoinductivo del aloinjerto de hueso desmineralizado liofilizado, pero no estimula por sí solo el crecimiento de hueso; y la osteogénesis que se produce cuando los osteoblastos vitales procedentes del material de injerto óseo contribuyen al crecimiento de hueso nuevo con el crecimiento generado a través de los dos mecanismos: osteoconducción y osteoinducción (17).

Una de las características importantes del tejido óseo es su capacidad para formar nuevas osteonas cuando la estructura ósea es dañada (4) por lo que puede repararse por sí mismo en respuesta a un trauma o una lesión (18). Sin embargo, si la lesión excede el tamaño crítico, la formación y regeneración ósea falla (19).

1.2.1 Mecanismos de Regeneración Tisular

Los procesos de reparación han sido estudiados por años y hasta el momento podría decirse que no están completamente entendidos, pero se sabe que es una combinación de la osteoconducción, donde un material actúa como un andamio para el nuevo crecimiento de hueso dentro del mismo y células osteoprogenitoras que permiten la osteoinducción; una combinación de señales y células que dan lugar a la formación de nuevo hueso (4).

La cicatrización secundaria es la forma más común de reparación cuando existe una fractura y consiste en osificación endocondral e intramembranosa, mediante los siguientes pasos (20):

- a) Respuesta inflamatoria aguda

- b) Reclutamiento de células madre mesenquimatosas
- c) Generación de un callo cartilaginoso y óseo
- d) Revascularización y neoangiogénesis en el sitio de la lesión
- e) Mineralización y reabsorción del callo cartilaginoso
- f) Remodelación ósea

1.2.1.1 Respuesta inflamatoria aguda

Inmediatamente después de un trauma, se forma un hematoma que consiste en células de sangre periférica e intramedular, el cual coagula formando una plantilla para la formación de un callo. Los picos de la respuesta inflamatoria aguda ocurren entre las primeras 24 horas y se completan a los 7 días. La respuesta inflamatoria inicial involucra producción y la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) 1, 6, 11 y 18. Estos factores se encargan de reclutar células inflamatorias que promuevan la angiogénesis. Como se observa en la figura 1, el TNF- α es producido por macrófagos y otras células inflamatorias y se ha observado en estudios *in vitro* que induce la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimatosas. La IL-1 β induce la producción de IL-6 por los osteoblastos, lo cual promueve la formación de un callo cartilaginoso primario. La IL-6 esta última solo se produce durante la fase aguda y estimula la angiogénesis, la producción de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos.

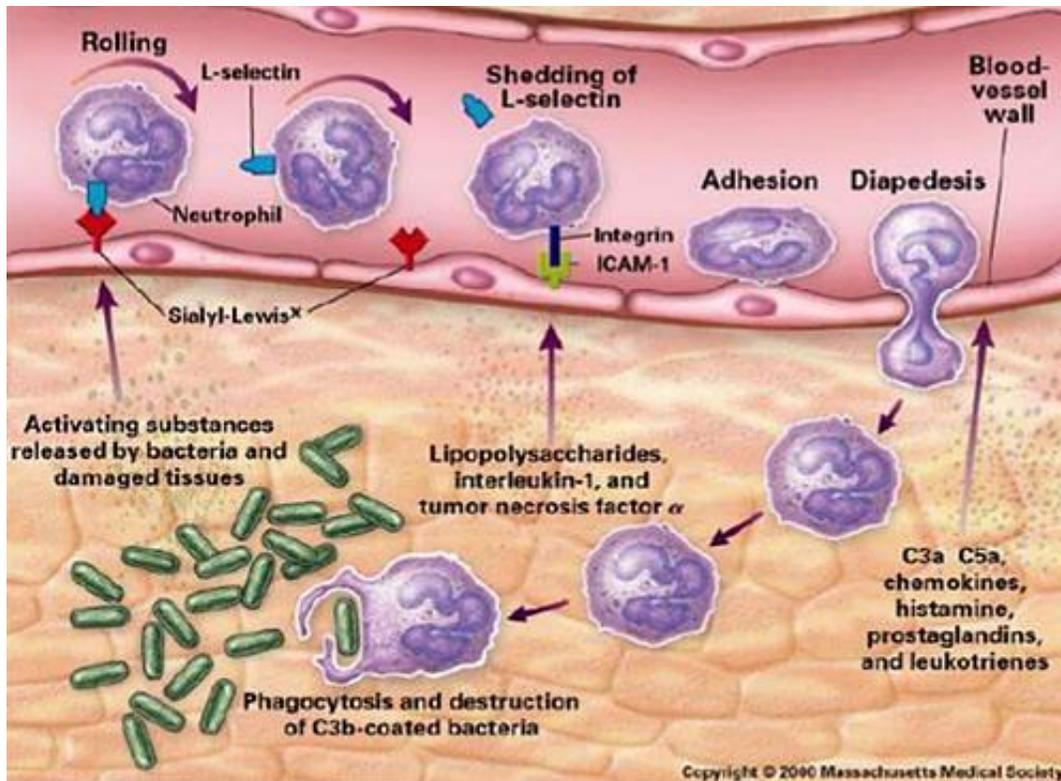


Figura 1. Inflamación aguda. Tomada de Romo (21). Proceso de quimiotaxis ocasionado por inflamación aguda

1.2.1.2 Reclutamiento de células troncales mesenquimales

Las MSCs son reclutadas para diferenciarse en células osteogénicas y de esta manera pueda darse la regeneración ósea. Hasta el momento no se conoce exactamente de donde provienen estas células, aunque la mayoría de los datos indican que derivan de tejidos blandos circundantes como la corteza, periostio y médula ósea. Se ha sugerido que la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) tiene un papel importante en el reclutamiento de las células madre mesenquimales, aunque otros estudios sugieren que el factor derivado de células estromales es la llave reguladora de su llegada al sitio del trauma (22).

1.2.1.3 Generación de un callo cartilaginoso y óseo

Después de la formación del hematoma primario, se forma un tejido de granulación rico en fibrina en los extremos de la fractura, dentro de este tejido ocurre la osificación endocondral que forma un callo blando el cual provee a la zona de la lesión una estructura estable, al mismo tiempo se da una osificación intramembranosa que ocurre directamente adyacente a los extremos distal y proximal de la lesión generando un callo duro, el cual provee a la fractura de una estructura semi-rígida (22).

La generación de estos tejidos callosos depende del reclutamiento de las MSCs, una vez reclutadas la cascada molecular induce la producción de matriz de colágena tipo I y II y la participación de diferentes péptidos moleculares de señalización, en este proceso la súper familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es de gran importancia. Además, como ya se mencionó, la BMP-2 es crucial para la iniciación de la cascada de reparación (20, 22).

1.2.1.4 Revascularización y neoangiogénesis en el sitio de la lesión

Para lograr la reparación exitosa de la lesión ósea, es esencial un buen suministro sanguíneo y una revascularización. El proceso de vascularización es regulado principalmente por dos vías: una dependiente de la angiopoyetina y la dependiente del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Las angiopoyetinas son proteínas morfogénicas vasculares, los tipos que participan principalmente en este proceso son las angiopoyetinas 1 y 2. La vía del VEGF es considerada la clave de la regeneración vascular, se ha mostrado que osteoblastos y condrocitos expresan altos niveles de este factor, el cual promueve la formación de vasos sanguíneos y transforma la matriz

cartilaginosa en un tejido óseo vascularizado. El VEGF promueve la vasculogénesis mediante la agregación y proliferación de MSCs en el plexo vascular y la angiogénesis, por lo tanto juega un papel crucial en la neoangiogénesis y revascularización, ya que se ha reportado que el bloqueo de sus receptores inhibe el crecimiento vascular y retrasa o interrumpe el proceso regenerativo (23).

1.2.1.5 Mineralización y reabsorción del callo cartilaginoso

Para que la regeneración ósea continúe, es necesario que el callo cartilaginoso blando sea reabsorbido y reemplazado por un callo óseo duro, esto es desarrollado con una combinación de proliferación y diferenciación celular, incrementando el volumen celular y la deposición de matriz. El desarrollo y regeneración ósea es fortalecido con la participación de la familia de moléculas Wnt, estas proteínas activan tres vías intracelulares: beta-catenina (vía canónica), calcio (Ca^{2+}) y la vía de polaridad celular planar. La primera es la dominante en la regulación de la diferenciación de las MSCs en un linaje osteoblástico y en las largas etapas del desarrollo, posiblemente regule la formación de hueso (20).

La reabsorción del cartílago mineralizado es realizada por una serie de pasos orquestados principalmente por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el ligando del receptor activador del factor nuclear κB (RANKL), osteopogerina (OPG) y el $\text{TNF-}\alpha$. Se piensa que durante este proceso M-CSF, RANKL y OPG median la diferenciación de células óseas y osteoclastos para formar tejido óseo. El $\text{TNF-}\alpha$ promueve ampliamente el reclutamiento de células madre mesenquimatosas con

potencial osteogénico, pero su función más importante en este caso, debe de ser iniciar la apoptosis de condrocitos (24).

El mecanismo de mineralización, involucra a la mitocondria donde se acumula el calcio contenido en gránulos, los cuales son transportados a la matriz extracelular donde son precipitados con fosfato y forman los primeros depósitos minerales, estos depósitos de calcio y fosfato se convierten en los nichos para la nucleación homogénea y la formación de nódulos de hidroxapatita. Conforme la formación de un callo duro progresa y el cartílago mineralizado es reemplazado con tejido óseo, el callo se vuelve más sólido y mecánicamente rígido.

1.2.1.6 Remodelación ósea

Aunque el callo duro es una estructura rígida que provee una estabilidad biomecánica, no se encuentran completamente restauradas las propiedades biomecánicas de un hueso normal. Para lograr esto, comienza una segunda fase de reabsorción en la cascada de reparación ósea, esta vez para remodelar el callo duro en una estructura de hueso lamelar con una cavidad central medular. Esta fase es bioquímicamente orquestada por $IL-1\beta$ y $TNF-\alpha$, las cuales muestran altos niveles de expresión durante esta etapa, de manera opuesta a la mayoría de los miembros de la familia de $TGF-\beta$ que han disminuido su secreción para este momento. Algunas BMPs como la BMP2, están también aparentemente relacionadas en esta fase, con niveles de expresión razonablemente altos (25).

El proceso de remodelación ósea es llevado a cabo por un balance entre la reabsorción del callo por osteoclastos y la deposición de hueso lamelar por osteoblastos. Aunque

el proceso puede ser iniciado en situaciones muy tempranas, a las 3 o 4 semanas, la remodelación toma años para ser completada y lograr una total regeneración de la estructura ósea.

Para una remodelación ósea exitosa, es crucial el adecuado suministro sanguíneo y un incremento gradual en la estabilidad mecánica. Esto es claramente demostrado en los casos donde no hay una buena irrigación sanguínea ni estabilidad mecánica, resultando en el desarrollo de un tejido atrófico fibroso. Existen casos donde hay una buena vascularidad pero una fijación inestable, el proceso de reparación progresa formando un callo cartilaginoso, pero resulta una unión no hipertrófica o pseudoartrosis (26).

En la actualidad la ingeniería de tejidos ha estudiado diversos tipos de materiales tanto naturales como sintéticos utilizados con el principal objetivo de crear condiciones adecuadas para las células y que estos posean la capacidad de biodegradarse para facilitar el proceso de remodelación ósea.

1.3 BIOMATERIALES EN REGENERACIÓN ÓSEA

Varios sustitutos óseos se han popularizado en los últimos 10 años y han sido utilizados por los médicos que tratan la reconstrucción de defectos óseos. Estos materiales pueden ser osteoconductivos, es decir, sirven como un andamio para el crecimiento interno de capilares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras (5). Este proceso generalmente requiere al menos tres paredes de hueso circundante para proporcionar la estimulación del crecimiento óseo. El injerto de hueso autólogo es el material más predilecto, ya que posee propiedades de osteoconducción (propiedad

que estimula las MSCs para formar células óseas) y osteoinducción, es por estas características que es considerado el mejor material para realizar regeneración ósea.

Los injertos tienen diferentes propiedades:

Osteogénesis: síntesis de hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del hospedero. Requiere células capaces de generar hueso (27).

Osteoinducción: proceso por el que las MSCs son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogénicas óseas (BMP) 2, 4 y 7, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleucinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina.

Osteoconducción: proceso en el que tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimatosas, desde la zona receptora del hospedero hacia el injerto. Este andamiaje permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón previsible, determinado por la biología del injerto y el entorno mecánico de la interfase hospedero-injerto (27).

De manera ideal un injerto óseo debe tener estas tres propiedades, además de ser biocompatible y proporcionar estabilidad mecánica. Actualmente los investigadores han llegado a la conclusión de que la regeneración depende de un andamio

tridimensional capaz de soportar la formación ósea. Los biomateriales como andamios para ingeniería tisular pueden ser clasificados en: polímeros sintéticos (como el ácido poliglicólico o el ácido poliláctico), materiales derivados naturalmente (colágena, quitosán o alginato) y matrices de tejido acelular (submucosa de vejiga porcina e intestino delgado). Se ha observado que los polímeros sintéticos aunque son ampliamente usados en ingeniería tisular y están aprobados por la Food and Drugs Administration (FDA), tienen la desventaja de que su degradación provoca un ambiente ácido debido a la formación de ácido láctico y glicólico (28), además de su inactividad biológica y restos ácidos, catalíticos residuales y partículas a microescala que acompañan su degradación. Los biomateriales derivados naturalmente y las matrices extracelulares presentan una mejor biocompatibilidad y biodegradabilidad (29, 30).

1.3.1 Matriz Extracelular

La MEC es una red compleja compuesta por proteínas de colágeno, fibronectina y otras proteínas entrelazadas en proteoglicanos (31). La MEC no solo sirve como material de apoyo sino también actúa regulando las funciones celulares, como la proliferación, migración y diferenciación celular (32), a través de modular la transducción de señales activadas por diversas moléculas bioactivas, como las mismas fibras proteicas, factores de crecimiento y citocinas (33). Además, ésta también protege de las fuerzas de aplastamiento del tejido y proporciona los nutrientes esenciales para su funcionamiento.

La ultraestructura y arquitectura en tercera dimensión de los andamios de MEC pueden ser en gran parte preservados a lo largo de pasos requeridos para la descelularización de los tejidos (34, 35). Las características ultraestructurales de la matriz desempeñan un papel importante en la modulación del comportamiento de las células que contactan los andamios con la habilidad de migrar a un andamio (34) o ser influenciadas por células de tejidos específicos (36, 37). Todas las MEC comparten en común características que proveen un soporte estructural y sirven como reservorio de factores de crecimiento y citocinas, lo que la convierte en el andamio ideal para la reparación y reconstrucción tisular (38).

Los andamios biológicos compuestos de MEC han demostrado la facilidad para remodelar y reconstruir diferentes tejidos tanto en estudios animales como en humanos. Los andamios de MEC consisten de moléculas estructuradas y funcionales secretadas por las células de cada tejido y órgano. Por lo tanto, la distribución y composición específica de la MEC puede variar dependiendo del tejido de donde provenga, ya que los andamios obtenidos de tejidos y órganos descelularizados ofrecen la ventaja de mantener las estructuras de sus respectivos tejidos y órganos.

Dentro de las MEC se han identificado 20 tipos de colágena diferentes, el colágeno tipo I se puede encontrar en un 90%, pero también se encuentran otros tipos de tejidos en cantidades muy pequeñas. Estos tipos de colágena alternativos pueden proveer distintas propiedades físicas y mecánicas a la MEC y contribuir a que sea un andamio para la regeneración tisular. La colágena tipo IV es un ligando importante para las células endoteliales y sirve como fibrillas de anclaje de los queratinocitos a la membrana basal, la tipo VI funciona como un conector de las proteínas funcionales y

glucosaminoglucanos proporcionando una consistencia tipo gel a la MEC. Esta diversidad de colágenas en un solo andamio sería muy difícil de reproducir como un compuesto *in vitro*. Por ello, la MEC es una fuente rica en diferentes tipos de colágena y la concentración y orientación de estas colágenas proveen un ambiente ideal para el crecimiento celular *in vitro* e *in vivo*. La fibronectina es la segunda proteína en cantidad dentro de la MEC, se ha observado que es responsable de la adhesión de células endoteliales en estudios *in vivo*, además por sus características “amigables” con las células se ha convertido en un ligando atractivo usado como recubrimiento en algunos materiales sintéticos para promover su biocompatibilidad. La laminina es una compleja proteína de adhesión con una función importante en el mantenimiento de estructuras vasculares.

Debido a sus propiedades versátiles, la MEC derivada de tejidos descelularizados se ha estudiado ampliamente como una fuente de andamios biológicos para la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Hasta ahora, muchos estudios se han centrado en la descelularización de tejidos y órganos, incluyendo la submucosa del intestino delgado, válvulas del corazón, vasos sanguíneos, piel, nervios, tendones, ligamentos, vejiga urinaria, cuerdas vocales, membrana amniótica, corazón, hígado y pulmón (39-47).

Estos diferentes tipos de MEC pueden clasificarse en dos grandes tipos, las provenientes de piel y submucosa y las de membrana basal. Las MEC de piel y mucosa residen subyacentes a las estructuras que son ricas en células epiteliales como la submucosa del intestino delgado y la epidermis de la piel, respectivamente. Estas formas de matriz extracelular contienen primariamente colágena tipo I y sitios

específicos para glucosaminoglucanos, así como una amplia variedad de factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento celular vascular y endotelial y factor de crecimiento epidérmico. En contraste, la MEC de la membrana basal que reside inmediatamente por debajo de células epiteliales, como las células de la vejiga urinaria, las células endoteliales de los vasos sanguíneos y los hepatocitos del hígado, presentan diferentes proteínas incluyendo la fibronectina, laminina, colágena tipo IV y enactina.

En la actualidad existen estudios en los que se ha comprobado que la matriz de la vejiga urinaria (MEC-VU) presenta las mejores propiedades biológicas para ser considerado un bioandamio excelente para la regeneración tisular; también se ha observado que contiene el mismo tipo de colágena que la matriz de intestino delgado, así como colágena tipo VI y VII. La MEC-VU contiene una variedad de glucosaminoglucanos, incluida la heparina, heparán sulfato, sulfato de condroitin y ácido hialurónico. Varios reportes sugieren que ésta puede proveer un buen soporte para regeneración tisular (48). Lo que diferencia a esta MEC de las obtenidas de otros órganos, es la presencia de una mayor cantidad de fibronectina, colágena tipo IV, laminina, enactina y glicosaminoglucanos, hasta el momento ha mostrado excelentes capacidades en la regeneración, con formación de músculo liso innervado y organizado (49).

1.3.1.1 Matriz Extracelular de Vejiga Urinaria (MEC VU)

La matriz extracelular de vejiga urinaria (MEC VU) está formada por parte del tejido conjuntivo, está compuesta por casi 90% de colágena mayormente de tipo I, así como

también glucosaminoglucanos, incluida la heparina, sulfato de heparán, sulfato de condroitin, ácido hialurónico y el colágeno tipo IV característico que se ha descrito como un ligando para células endoteliales facilitando la angiogénesis.

En un estudio realizado por Liu, Li (50), se evaluaron diferentes tipos de MEC, de submucosa del intestino delgado, vejiga urinaria, piel, vesícula biliar y pericardio de cerdos miniatura. Después de realizar diferentes exámenes como la caracterización de la superficie, absorción de agua, examen de fuerza, actividad antimicrobiana, análisis de citotoxicidad y de unión celular llegaron a la conclusión de que la MEC formada a partir de vejiga urinaria presenta propiedades biológicas muy superiores y que puede funcionar como un andamio ideal para reconstrucción en un futuro, aunque al ser este un estudio *in vitro* estos hallazgos deben ser confirmados en estudios con aplicaciones preclínicas en animales y posteriormente en pruebas clínicas en humanos.

Farhat, Chen (51), analizaron la localización y expresión de diferentes proteínas y propiedades mecánicas tanto en vejiga completa como en acelular. Se evaluó la descelularización de la matriz con una tinción de hematoxilina y eosina, el contenido de ADN, la distribución de elastina, colágena tipo I, III, IV, laminina, fibronectina y otras proteínas con ayuda de western blot, además de evaluar el grosor, el área transversal, la rigidez y el módulo de elasticidad. En la tinción de H&E no se observaron citoesqueletos residuales y en el examen de contenido de DNA se reportó en el tejido completo $0.27 \mu\text{g mg}^{-1}$, mientras que en la MEC disminuyó hasta $0.0075 \mu\text{g mg}^{-1}$, lo cual puede ser considerado una cantidad mínima. En cuanto a los componentes fibrilares se observó que todos éstos se mantienen después de la descelularización

con una pérdida mínima a diferencia del colágeno tipo III el cual se presenta una pérdida significativa. En cuanto a las propiedades mecánicas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grosor, área y módulo elástico de la MEC, éste último aumentó hasta tres veces en comparación con el tejido de vejiga completo. La conclusión fue que la MEC-VU es un material que conserva inalterada su arquitectura a base de colágena comparada con el tejido completo (a excepción de la colágena tipo III) y que los cambios en las propiedades mecánicas son mínimos y esto se relaciona con el hecho de que se conservan las principales proteínas estructurales (colágeno y elastina).

En el año 2010 Brown *et al.*, realizaron un estudio sobre la evaluación de la superficie y composición de tres matrices extracelulares a partir de SIS (submucosa de intestino delgado), VU e hígado, ya que estos autores comentan que es esencial caracterizar y considerar la superficie de una andamio, pues esto puede afectar la unión celular y la reconstrucción de tejidos en un complejo tridimensional. Se analizó la superficie con ayuda del microscopio electrónico de barrido (MEB) y se observó una ultraestructura diferente, mientras la MEC de SIS y VU es muy similar, ya que la distancia entre las fibras de colágena es parecida, la de hígado es una red más densa de fibras de colágena. En cuanto a la composición, con ayuda del espectrofotómetro de masas se observó que todas estas matrices contienen como componentes principales colágena tipo I, laminina y fibronectina, aunque no todas las proteínas pudieron ser examinadas, ya que existe un rango limitante al utilizar este equipo; también cabe hacer notar que aunque estos tres componentes fueron encontrados en las tres matrices, existieron picos que solamente fueron encontrados en las MEC de VU y SIS, se llegó a la

conclusión de que esto podía ser debido a los diferentes métodos utilizados para la descelularización de las diferentes MEC (52).

Investigadores como So Young Chun *et al.* (2007) en su estudio realizado identificaron y caracterizaron los factores bioactivos de la matriz extraída de la submucosa de vejiga porcina. En este estudio se evaluó la cantidad de factores bioactivos presentes en la matriz extracelular descelularizada por tres métodos de extracción 0.1% Tritón X, 0.5 M ácido acético y 2 M urea, observando que el primero alcanzó mejores niveles de concentración de proteínas con una concentración de 112.1 ± 4.3 mg/g, mientras que las dos últimas presentaron concentraciones de 98.1 ± 3.5 mg/g y 79.4 ± 2.5 mg/g respectivamente, estos resultados mostraron que dependiendo del método de extracción es la concentración final de proteínas. En la prueba de cuantificación de factores de crecimiento (factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), keratinocitos (KGF), factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF β 1), factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1), factor de crecimiento fibroblástico básico (BFGF), factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento transformante α (TGF α) por examen de ELISA, el método con ácido mostró mejores resultados. PDGF-BB, KGF y VEGF mostraron las más altas concentraciones, esto debido a que algunos reportes mencionan que los factores de crecimiento son estables en condiciones ácidas y conservan su actividad, la presencia fue confirmada por análisis de Western blot. También fue evaluada la presencia de colágena tipo 1, 2, 3 y 4 teniendo como resultados que la colágena tipo 1 y 4 fueron las que se encontraron en mayor cantidad. Entre los factores de crecimiento identificados en la matriz extracelular BSM, VEGF,

KGF y PDGF-BB fueron los que predominaron, cada uno de estos factores de crecimiento tiene un efecto sobre el crecimiento celular y el tejido de regeneración. VEGF promueve la angiogénesis, la permeabilidad vascular de las células endoteliales y estimulación de las células endoteliales para la proliferación y migración, KGF media la proliferación celular epitelial y la diferenciación en variedades de tejidos, PDGF-BB promueve muchos procesos requeridos para la reparación de los tejidos, incluyendo quimiotaxis, proliferación, angiogénesis y la cicatrización. Como conclusión estos autores mencionan que la MEC-VU presenta por lo menos 9 diferentes factores de crecimiento (53).

1.3.1.2 Matriz Extracelular Ósea Bovina

El hueso es un tejido conjuntivo extremadamente duro y con gran plasticidad, presentando un metabolismo altamente complejo, con potencial de reparación envolviendo iones, células, hormonas, proteínas y factores nutricionales. El tejido óseo posee una alta capacidad de reparación espontánea cuando es lesionado, reponiendo después de un breve intervalo de tiempo, toda la partes perdida (54). Entre tanto, existen algunos casos en que los defectos son extensos y no tienen la capacidad de repararse espontáneamente, por lo que es necesario utilizar diversas técnicas quirúrgicas en la tentativa de reparación de la deficiencia ósea (55).

Los estudios afirman que el hueso autógeno es el mejor material para injertar, pero varios sustitutos de tejido óseo han sido propuestos para evitar la morbilidad del sitio donante y el aumento del tiempo operatorio, buscando crear o extraer de la naturaleza

materiales que promuevan el incremento de la reparación y neoformación ósea, siendo biocompatibles, osteoconductores y osteoinductores (56).

La matriz ósea está compuesta por dos fases principales a escala nanométrica: La orgánica que representa aproximadamente el 35% del peso seco del hueso. Formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%), tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia, en pequeñas proporciones, de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, constituido bajo estrés mecánico (57).

La molécula de colágeno contiene a los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, este último un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno. El 10% restante lo forman proteínas no colagénicas (proteoglucanos o glucoproteínas) (57).

1.3.1.3 Hidrogeles derivados de matriz extracelular descelularizada

Hidrogeles polimerizables inyectables *in situ* han sido utilizados frecuentemente para aplicaciones biomédicas como distribuidor de células, liberación de medicamentos, y/o como un andamio para la reconstrucción de tejido dañado. Los hidrogeles inyectables tienen características deseables por la aplicación terapéutica incluyendo administración dirigida por técnicas de mínima invasión, fácil y rápida liberación, y una habilidad rápida de llenar espacios de forma irregulares, formando una polimerización para soportar la estructura adecuada para la inflamación celular y la remodelación. Muchos de los hidrogeles investigados tienen polímeros sintéticos con una estructura química definida y propiedades mecánicas aptas para la aplicación clínica, sin embargo, hay un número de recientes descripciones de los hidrogeles inyectables

derivados de materiales biológicos naturales, los cuales poseen una biocompatibilidad y bioactividad superior comparada con sus contrapartes sintéticos.

Se ha demostrado que los andamios biológicos compuestos de matriz extracelular de tejido descelularizado puede ser parcialmente digerido con pepsina, solubilizado y polimerizado *in situ* para formar un hidrogel (58). Los andamios de MEC retienen numerosas moléculas constitutivas encontradas en los tejidos intactos para la adhesión celular, factores de crecimiento y glucosaminoglucanos. Estos materiales apoyan la reconstrucción de un sitio remodelando la respuesta incluido el tejido muscular (59), tejido cardíaco (60) y nervios del sistema periférico (61). Es posible que un hidrogel formado por degradación enzimática y solubilizada pueda mantener su actividad biológica como la encontrada en MEC intacta.

A diferencia de los hidrogeles sintéticos, las propiedades físicas y estructurales de hidrogeles de MEC no se han caracterizado a fondo y los métodos óptimos para el control de estas propiedades no se entienden por completo. Probablemente factores determinantes de las propiedades de los hidrogeles incluyen la fuente de tejido y los métodos descelularización utilizados para preparar la MEC y la concentración de la MEC del hidrogel.

En el 2010 Matthew T. Wolf *et al*, realizaron un estudio donde sintetizaron hidrogeles de MEC a base de dermis porcina (MEC-D) y MEC-VU; se compararon las propiedades mecánicas y características *in vitro* e *in vivo*. Teniendo como resultado en las pruebas de almacenamiento y el módulo de pérdida, un aumento después de la digestión con pepsina. Tanto MEC-D como MEC-VU mostraron un aumento en la velocidad de gelificación con el aumento de la concentración. El estadio final del módulo de

almacenamiento constante de los hidrogeles de MEC-D aumentó rápidamente de forma no lineal con la concentración, mientras que los hidrogeles de MEC-VU tuvieron un aumento lineal en base a las tres concentraciones evaluadas. Ambos hidrogeles presentaron el mayor módulo a la concentración 8 mg/ml con un módulo de almacenamiento de 466.5 ± 64.3 y 182.2 ± 36.5 Pa, respectivamente. En lo que respecta a las pruebas *in vitro* con fibroblastos NIH 3T3 cultivadas en la superficie y dentro de ambos hidrogeles a las concentraciones de 6 y 8 mg/mL fueron viables después de 7 días. Los fibroblastos fueron confluentes en la superficie con una morfología de adoquines, y no se observaron diferencias en la viabilidad en ambos tipos de hidrogeles, concentraciones, o el método del cultivo celular. El análisis histológico de fibroblastos sembrados en la superficie de los hidrogeles de MEC mostró una monocapa confluyente de células a los 3 y 7 días, y diferentes grados de infiltración, pudiendo observar que los fibroblastos cultivados se distribuyeron por todo el hidrogel, con una mayor densidad celular en la superficie del hidrogel en comparación con el centro (59).

Se concluyó que estos resultados indican que las propiedades físicas y biológicas de un hidrogel de MEC pueden alterarse o al menos puede ser controlada parcialmente por el andamio específico utilizado y la concentración de MEC. Por lo tanto, el hidrogel de MEC debe presentar una concentración o densidad adecuada en la cual las células sean capaces de migrar y mantener su viabilidad.

Sin embargo, no solo fibroblastos pueden utilizarse para la colonización de estos andamios sino también MSCs. Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) han demostrado ser capaces de diferenciarse en linajes osteogénicos, adipogénicos y

condrogénicos. Tradicionalmente, la diferenciación de estas células se ha logrado mediante la adición de señales solubles al medio de cultivo. Las funciones y mecanismos de diversos aditivos de medios de comunicación en la inducción de la diferenciación de hMSC se han estudiado ampliamente. Por ejemplo, la dexametasona, la proteína morfogenética ósea (BMP) y fosfato β -glicerol han demostrado ser un buen regulador de la expresión de genes relacionados con osteogénesis en hMSC (62).

1.4 CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

Las células troncales son células que tienen la capacidad de autorenovarse a través de la mitosis y a su vez diferenciarse en una diversidad de células especializadas. Estas pueden clasificarse de acuerdo a su estadio de potencialidad o de acuerdo al órgano o tejido de procedencia. Las células troncales totipotentes tienen la habilidad de formar la totalidad de un organismo, así como los tejidos extraembrionarios. Por su parte, las células troncales pluripotentes al igual de poder formar un nuevo organismo, no poseen la capacidad de formar tejidos extra embrionarios. Ambos estados de potencialidad son encontrados solo en células troncales embrionarias (CTE). A su vez, existen células troncales multipotentes, estas por el contrario solo tienen la capacidad de diferenciarse hacia alguna de las 3 capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) y pueden ser encontradas en tejidos adultos.

Entre las células troncales adultas se encuentran las MSC, originalmente aisladas de médula ósea adulta, aunque actualmente pueden obtenerse de otros tejidos tanto en la vida adulta como fetal. Las células troncales adultas normalmente generan tipos

celulares del tejido en el que residen. Sin embargo, los estudios han demostrado que las células troncales de un tejido podrían generar tipos celulares de un tejido completamente diferente (63).

El microambiente local representa un compartimento importante para mantener el estado de las células troncales. El microambiente regula el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación, como lo es la MEC ya que presenta sitios de unión para proteínas de adherencia celular. Esto conlleva a la estimulación de vías de señalización intracelular que dan paso a la liberación de factores de estimulación autócrinos y parácrinos. Esta comunicación intercelular se ha caracterizado entre células de carcinoma embrionario y células estromales (64).

Actualmente se han estudiado diversas fuentes de obtención de las células mesenquimales como la médula ósea, tejido adiposo, páncreas, hígado, dermis, membrana sinovial, sangre del cordón umbilical, pulpa dental, ligamento periodontal entre otros (65-67). Siendo la médula ósea, la sangre del cordón umbilical y el tejido adiposo los más empleados.

1.4.1 Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo

El tejido adiposo es derivado del mesoderma embrionario y contiene un estroma que puede ser aislado con facilidad. Actualmente, se ha demostrado que su fracción estromal contiene células madre multipotentes que pueden diferenciarse hacia linajes específicos tales como adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico (68).

El tejido adiposo es uno de los más abundantes del cuerpo humano, su acceso es sencillo, el procesamiento es fácil de realizar y en la mayoría de las personas es posible extraer varios mililitros de grasa sin perjuicio estético (69).

Las MSCs obtenidas del tejido adiposo tienen una morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación *in vitro* similar a las obtenidas de médula ósea, tienen una mayor capacidad de proliferación y es posible acceder más fácilmente a muestras de tejido adiposo a través de procedimientos como la abdominoplastia o liposucción. En la regeneración de tejidos.

Tabla 1 se describen otros aspectos comparativos de las principales fuentes de obtención de las MSCs (66, 70). La liposucción es uno de los procedimientos estéticos más realizados en el mundo y, aunque su objetivo original consiste en retirar la grasa no deseada, actualmente puede establecerse como la forma ideal de obtener células troncales mesenquimales adultas autólogas para intervenir en la regeneración tisular (70, 71).

En este trabajo se propone evaluar y comparar la capacidad de las MSC-AD para colonizar los hidrogeles naturales derivados de matriz extracelular de vejiga porcina y matriz extracelular ósea bovina con la finalidad de obtener materiales ideales para ser utilizados como bio andamios en la regeneración de tejidos.

Tabla 1. Comparación fuentes de obtención de células madre mesenquimales

PARAMETRO	Médula Ósea	Sangre de cordón umbilical	Tejido adiposo
Éxito de aislamiento	100%	30-34%	100%
Formación de monocapa adherente	4-5 días	2-4 semanas	4-5 días
UFC-F obtenidas en la monocapa adherente (número)	83 ± 61	0.002 ± 0.004	557 ± 673
Capacidad de diferenciación osteogénica	71.4%	100%	78.8%
Capacidad de diferenciación adipogénica	100%	0%	94%
Capacidad de diferenciación condrogénica	100%	100%	100%
Expresión de antígenos (%)			
CD44	97.5 ± 5.1	99.7 ± 0.5	99.8 ± 0.2
CD73	90.0 ± 20.0	99.3 ± 1.3	99.6 ± 0.5
CD90	99.1 ± 2.5	97.8 ± 7.1	99.6 ± 0.2
CD105	88.1 ± 7.4	72.4 ± 20.0	90.4 ± 5.9
HLA I	95.2 ± 6.0	94.3 ± 6.8	98.8 ± 2.8

Tomada de Kern, Eichler (70) y Wagner, Wein (66).

1.5 ANTECEDENTES

Kern, Eichler (70), las MSC-AD poseen características ideales por su migración y proliferación. El microambiente local representa un compartimento importante para mantener el estado de estas células.

Young, Ibrahim (58), sintetizaron hidrogel de MEC de tejido adiposo descelularizado ya que los andamios a base de biopolímeros enfrentan una reabsorción muy rápida o una adipogénesis limitada. Encontraron que el hidrogel de MEC de tejido adiposo es compatible con el crecimiento y supervivencia de las MSCs *in vitro*.

Wolf, Daly (59), prepararon hidrogeles de MEC de dermis porcina y MEC de vejiga urinaria descelularizadas para determinar la estructura, mecanismo y la respuesta celular *in vitro* / *in vivo* en los hidrogeles. Encontraron que en el hidrogel de dermis era más lento el infiltrado de las células que en el hidrogel de vejiga al igual que la degradación de la matriz era más lenta. Concluyeron en que el tipo de tejido, el método de descelularización y la concentración de la MEC son variables que pueden afectar las propiedades del hidrogel.

Soto-Sainz, Silva-Benítez (72), sintetizaron y evaluaron el hidrogel de MEC VU con la finalidad de obtener una fuente ideal para la creación de bioandamios naturales evitando la utilización de autoinjertos. En este estudio la matriz de vejiga urinaria fue descelularizada, liofilizada, pulverizada y digerida con pepsina para su posterior gelificación y utilizaron diferentes concentraciones de hidroxapatita, fosfato tricálcico y se evaluaron los factores de crecimiento. Concluyeron que el hidrogel de MEC de

vejiga porcina es un material ideal para la regeneración de tejido y que su procesamiento no conlleva la pérdida de factores de crecimiento.

Fernandes, Costa (73), utilizaron hidrogeles para observar el comportamiento de osteoblastos. Para la realización de este estudio las células se colocaron de diferente manera: entre 2 capas de hidrogel, inmersas en el hidrogel y sobre la superficie del hidrogel. En el cual, mediante un estudio de MTT se observó que la mayor proliferación y diferenciación celular se mostró cuando las células fueron inmersas en el gel, y cuando las células se colocaron en la superficie del hidrogel.

Ma, Yang (74), evaluaron el comportamiento celular sobre dos tipos de hidrogeles uno natural y uno sintético. También variaron la colocación de las células sobre los hidrogeles (homogenizadas en el gel, entre dos capas del gel y encapsuladas dentro del gel). Estos autores demostraron que el comportamiento celular está influenciado por el tipo de hidrogel, lo que significa que las células cultivadas en el hidrogel natural presentaron mayor capacidad de proliferación y propiedades osteogénicas sin diferencia significativa cuanto a la ubicación de las células cultivadas.

Chen y Thibeault (75), estudiaron la morfología celular, el ciclo de vida, la proliferación y proteínas de MSCs en un hidrogel. Por lo que encontraron un aumento significativo en la secreción de proteínas de colágeno I y factores de crecimiento, sin cambios en la morfología o viabilidad celular. Lo que indica que la aplicación de hidrogeles puede desempeñar un papel importante en la regeneración de tejidos.

Muñoz-Ruiz, Silva-Benítez (76), evaluaron histológicamente el efecto de la MEC-VU en defectos óseos. Los autores colocaron los biomateriales sobre defectos de 5 mm en el fémur de 20 conejos macho de raza Nueva Zelanda y tras 8 semanas se

realizaron cortes histológicos con tinción de Hematoxilina y Eosina. En este estudio se logró promover la neoformación de tejido óseo; encontrando un tejido con una estructuración organizada y con un bajo nivel de infiltrado inflamatorio.

2 JUSTIFICACIÓN

La pérdida de tejido óseo es un problema de salud a nivel mundial y hasta el momento el desarrollado de materiales de regeneración han mostrado resultados deficientes cuando existe una pérdida de tejido considerable. Se han diseñado hidrogeles de MEC-VU y MEC-OB para regeneración tisular, la biocompatibilidad es fundamental para la formación de nuevo tejido y su interacción con células mesenquimales, uno de los factores más relevantes es observar la colonización y penetración celular en estos hidrogeles de MEC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la penetración de células mesenquimales de tejido adiposo en geles de matriz extracelular ósea bovina y de vejiga porcina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad de penetración de las células troncales mesenquimales en un cultivo *in vitro* sobre hidrogeles de matriz extracelular de vejiga urinaria.
2. Evaluar la capacidad de penetración de las células troncales mesenquimales en un cultivo *in vitro* sobre hidrogeles de matriz extracelular ósea bovina.
3. Determinar la capacidad de colonización de las células troncales mesenquimales en un cultivo *in vitro* sobre la superficie de los hidrogeles de matriz extracelular.
4. Confirmar la morfología de las células troncales mesenquimales en un cultivo *in vitro* sobre los hidrogeles de matriz extracelular.

4 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

4.1 TIPOS DE ESTUDIO

Observacional, *in vitro*.

Estudio prospectivo, transversal, observacional y comparativo.

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

4.2.1 Hidrogel de Matriz Extracelular de Vejiga Urinaria (MEC-VU) y Ósea Bovina (MEC OB)

Los hidrogeles empleados fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAS.

4.2.2 Células Troncales Mesenquimales

Las líneas celulares utilizadas fueron las líneas primarias de células troncales mesenquimales de tejido adiposo. Estas líneas celulares se encontraban congeladas en un tanque de nitrógeno líquido en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAS. El protocolo a seguir para su recuperación fue el siguiente: se preparó medio de cultivo estándar (DMEM con suero fetal bovino al 10% y antibiótico al 1%) y se ambientó a 37 °C. Las MSC-AD se descongelaron en el baño María a 37 °C. Previamente se colocaron dentro de la campana de flujo laminar micropipetas, puntas estériles, tubos Falcon de 15 ml y frascos de cultivo los cuales se esterilizaron bajo luz ultravioleta por un ciclo de 20

minutos. La suspensión de células descongeladas se decantó en un tubo Falcon de 15 ml estéril y se agregó 1 ml de medio de cultivo estándar, luego se centrifugó a 1,500 rpm durante 10 min, para después decantar el sobrenadante y resuspender el paquete celular cuidadosamente en 1 ml de medio estándar. Por último se sembraron las células en un frasco de cultivo a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad dentro de una incubadora y se revisó continuamente los siguientes días para evaluar el crecimiento celular como se observa en la Figura 2, además se realizaron cambios de medio cada 3 días.

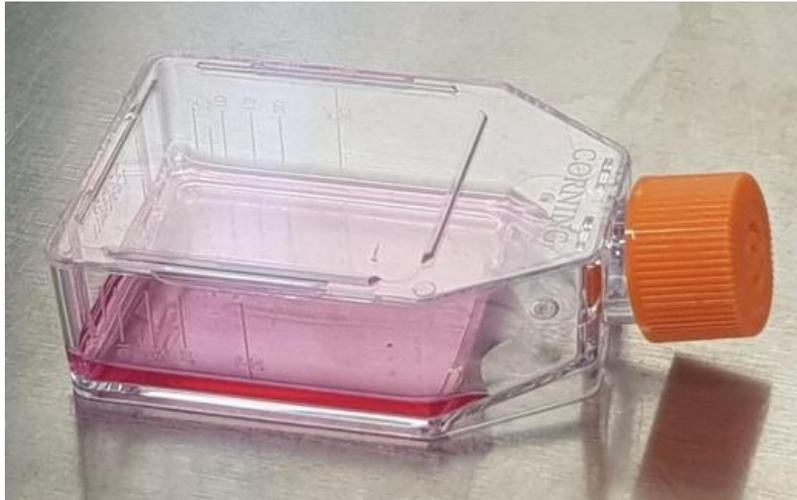
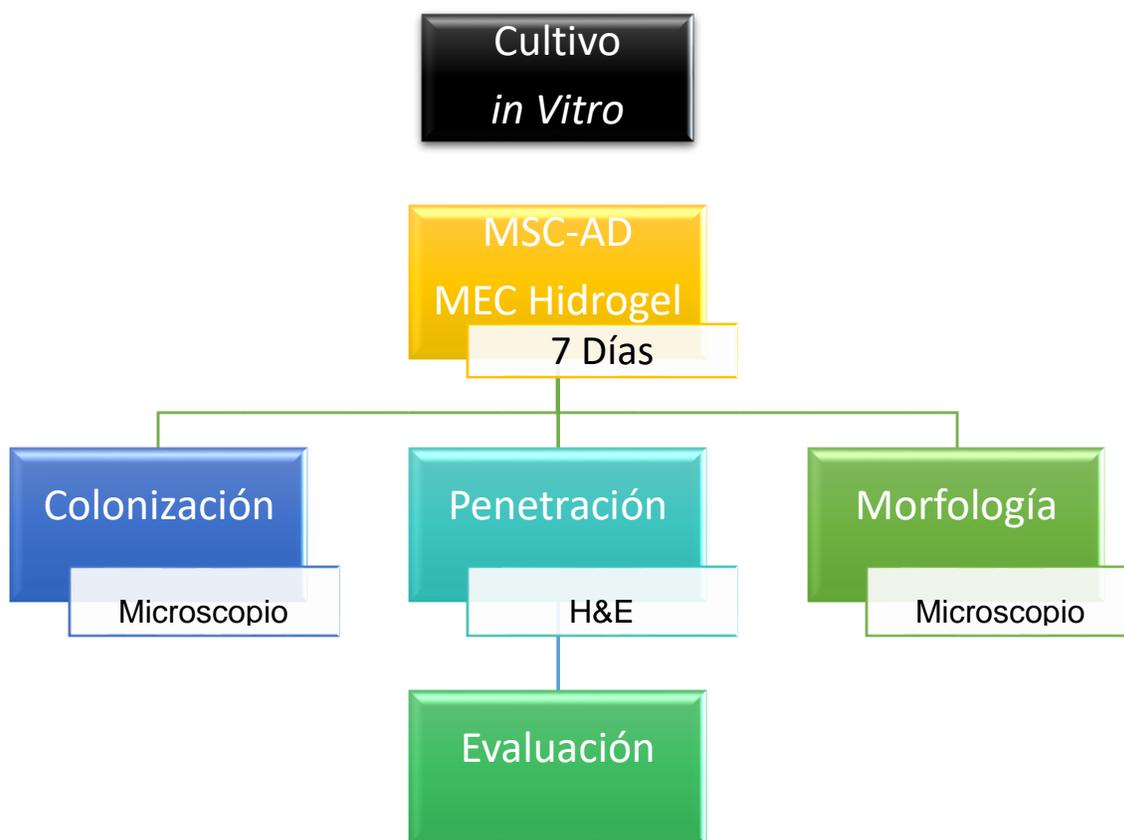


Figura 2. Cultivo de MSCs de tejido adiposo. MSC-AD cultivadas en medio estándar en caja de 25cm²

4.3 LOCALIZACIÓN

Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL



4.4.1 Ensayos de penetración de las MSCs sobre los hidrogeles

En una caja de 24 pozos se colocó 1ml de los diferentes hidrogeles por triplicado como se muestra en la Tabla 2, en la fila (A) el hidrogel de MEC-VU y en la fila (B) el hidrogel de MEC-OB (las columnas 1, 2 y 3 fueron para la evaluación a los 7 días). Los hidrogeles se irradiaron con luz UV durante 15 minutos y se dejaron gelificar durante una hora en la incubadora.

Tabla 2. Caja de cultivo de 24 pozos.

7 DÍAS						
	1	2	3	4	5	6
A	HV + Cel	HV + Cel	HV + Cel			
B	HO+ Cel	HO+ Cel	HO+ Cel			
C						
D						

Después de verificar la gelificación se colocó 1ml de medio estándar y se dejó 24 horas en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ como se observa en la Figura 3.

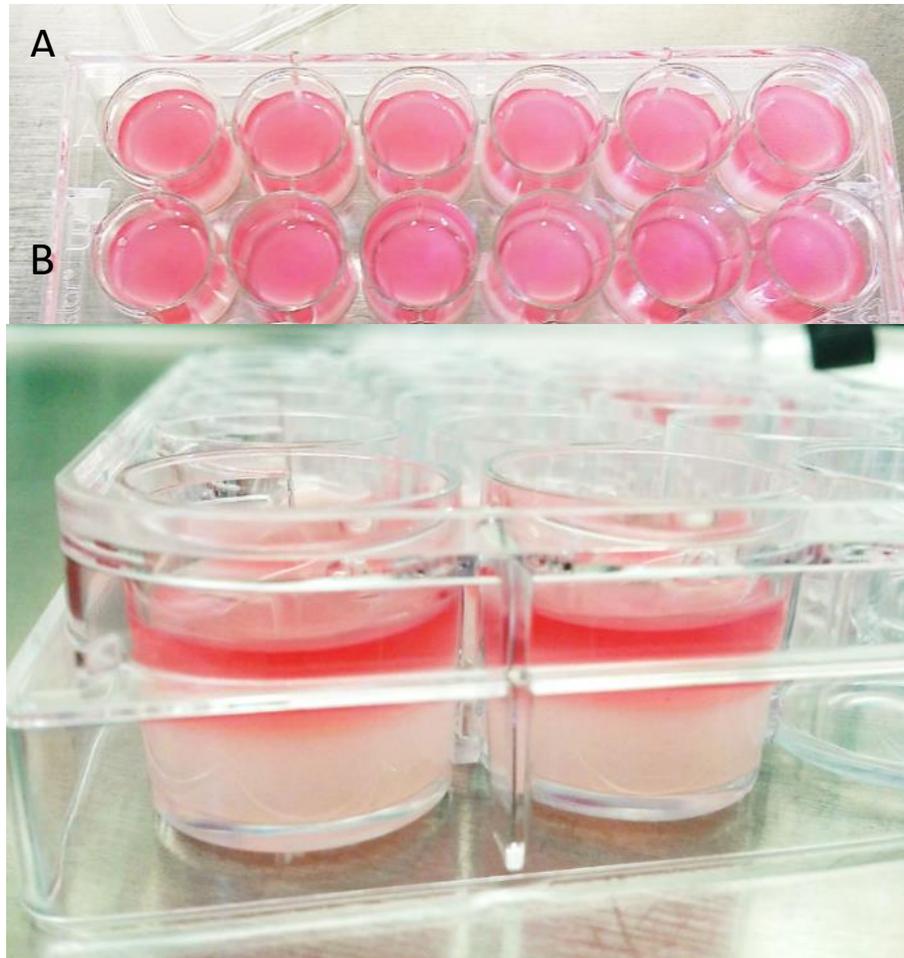


Figura 3. Caja de cultivo con hidrogel y medio estándar. A) distribución de los grupos en la placa de cultivo. B) observación de los hidrogeles con medio de cultivo desde una vista lateral.

Al día siguiente se colocaron 25,000 MSC-AD por pozo. Primero, las células MSCs se desprendieron de la monocapa mediante un tratamiento de tripsina EDTA al 0.25% y fueron incubadas a 37 °C en la incubadora de 3 a 5 minutos, una vez recuperadas se colocaron en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de medio estándar.

Se determinó la concentración y viabilidad celular como se observa en la Figura 4. Primero se tomaron 10 μ l de la suspensión celular en un tubo de 0.2 ml y 10 μ l de azul de tripano al 0.4%, se homogenizó por pipeteo y se colocaron 10 μ l en la cámara de Neubauer. Con ayuda de un microscopio óptico se cuantificaron las células vivas presentes en cuadrículas exteriores de la cámara y se determinó la cantidad de células mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de células} = (\text{promedio de células en las cuadrículas})(\text{dilución})(10^4)$$

De esta manera se determinó la cantidad de células presentes en la suspensión celular, por lo que mediante una regla de tres realizamos el cálculo para obtener 25,000 células, las cuales fueron colocadas en cada pozo.



Figura 4. Determinación de concentración y viabilidad celular. Cámara de Neubauer y tinción con colorante de exclusión de vitalidad azul de tripano.

Se realizaron las evaluaciones a los 7 días. Primero, antes del procedimiento histológico los hidrogeles se observaron en fresco en el microscopio óptico con una

magnificación de 10X para determinar la colonización en superficie y penetración celular.

Para la realización de los cortes histológicos el hidrogel se sacó del pozo de cultivo con una cucharilla y el fragmento de hidrogel se cortó a la mitad con un cubre objetos. Estos se colocaron en forma vertical en un molde de aluminio con polyfreeze y se congelaron exponiendo el molde con la muestra en nitrógeno líquido. Los cortes se realizaron en un criostato ejecutando corte de un grosor de 90 μm , estos se pasaron a una laminilla cargada con L-polilisina para facilitar la adherencia y se fijaron sumergiendo la muestra en acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Por último, se realizó el procedimiento de tinción con H&E para confirmar la penetración del hidrogel, figura 5.

4.4.2 Procedimiento de tinción H&E

Se cubrió la totalidad del tejido con hematoxilina de Harris durante 1 minuto y se lavó con suficiente agua destilada. Luego se sumergió en alcohol ácido durante 15 segundos y se lavó con suficiente agua destilada. Enseguida se sumergió en solución de NaHCO_3 al 0,01% durante 15 segundos y se lavó con suficiente agua destilada. Posteriormente se sumergió en eosina durante 15 segundos y se deshidrató en alcohol al 70% durante 15 segundos y luego en alcohol absoluto 2 veces durante 15 segundos. Por último, se pasó a xileno durante 1 minuto, se dejó secar y finalmente se montó en Entellan new.

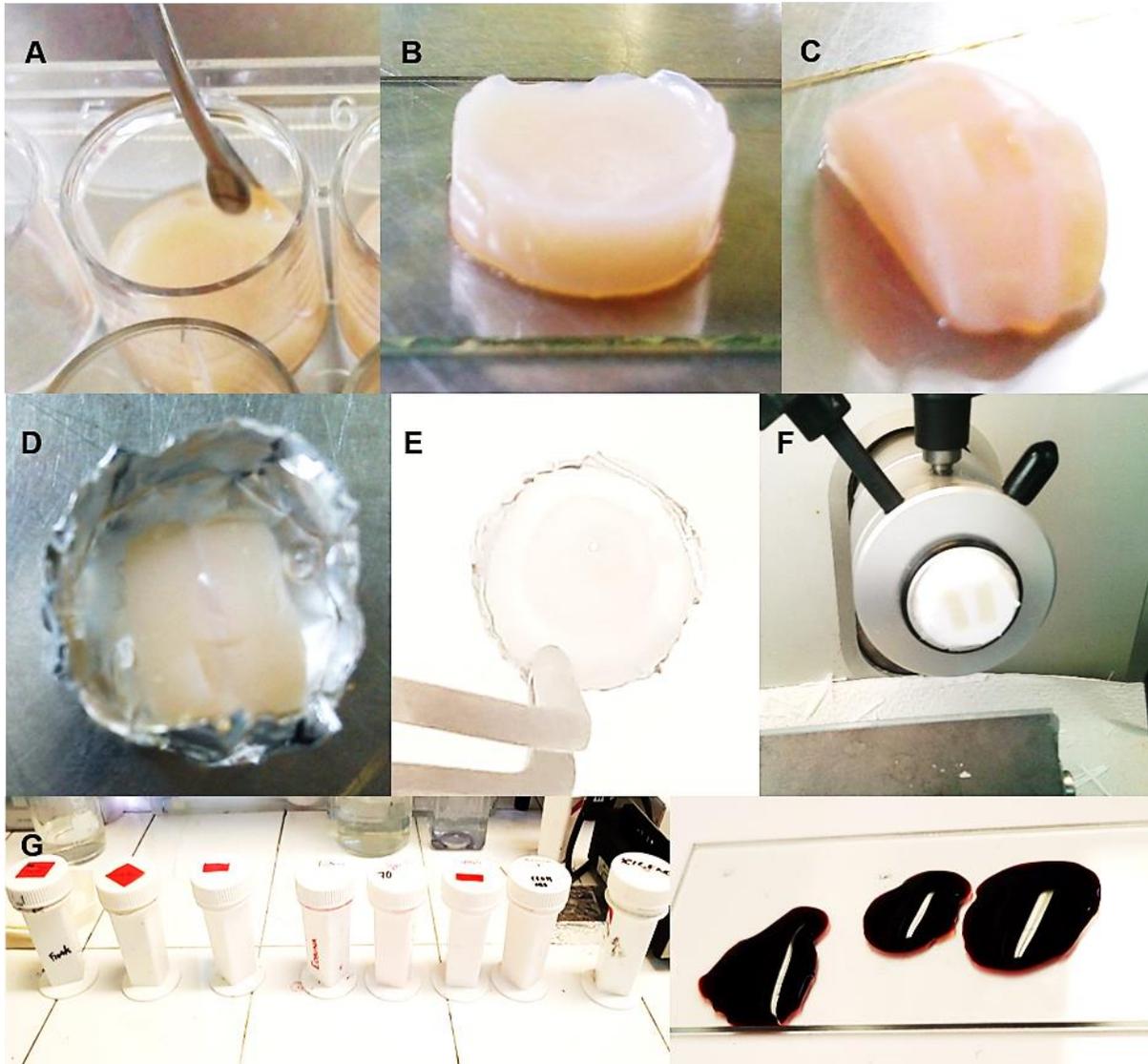


Figura 5. Obtención y procesamiento de la muestra. A) Remoción de hidrogel del pozo de cultivo, B) Obtención de la muestra del hidrogel fuera del pozo, C) Muestra de hidrogel con corte transversal, D) Hidrogel en molde de aluminio con poly-freeze, E) Congelación de la muestra sobre nitrógeno líquido, F) Cortes de 90 μ m en Crióstato, G) Tinción de la muestra con H&E.

5 RESULTADOS

5.1 OBSERVACIÓN EN FRESCO DE LA COLONIZACIÓN Y PENETRACIÓN CELULAR EN LA MEC

Se removió el hidrogel de cada pozo de la caja de cultivo para su evaluación al microscopio óptico de campo claro Figura 6.

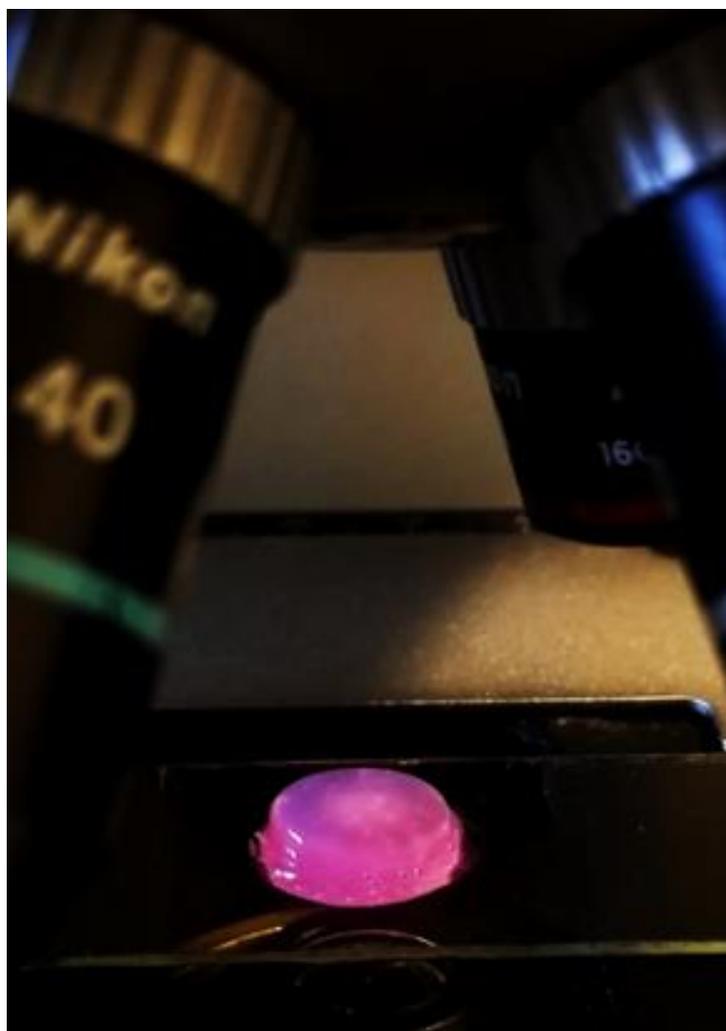


Figura 6. Observación en fresco del hidrogel al microscopio óptico. Hidrogel de MEC-VU colocado al microscopio para su evaluación.

Tras 7 días de cultivo de las MSC-AD sobre los hidrogeles de MEC-VU y MEC-OB se logró observar sobre su superficie una gran cantidad de células con morfología fibroblastoide en una confluencia del 50% del área de cultivo. Además, fue posible constatar que una parte de las células logró penetrar en el hidrogel y éstas, dentro del hidrogel, exhibían la misma morfología. Lo anterior, indica que el hidrogel permite la adherencia, penetración y proliferación de las células y que éste no provoca efectos citotóxicos figura 7. También, se observó una sola franja de migración celular o mono capa que se introduce dentro del hidrogel permitiendo el contacto entre las células figura 8. Este comportamiento se logró observar en ambos hidrogeles, corroborando que los hidrogeles de MEC son ambientes adecuados para la incorporación celular.

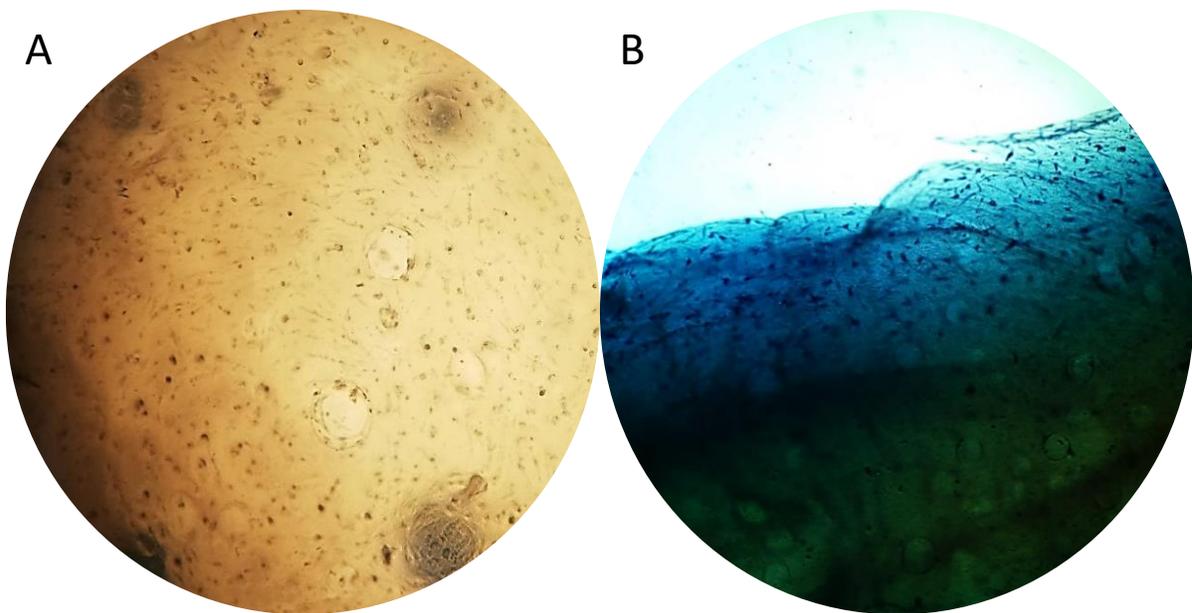


Figura 7. MSC-AD en contacto con hidrogeles de MEC-OB a los 7 días observadas al microscopio óptico de campo claro. A) MEC-OB superficie a 4X, B) MEC-OB corte transversal a 10X,

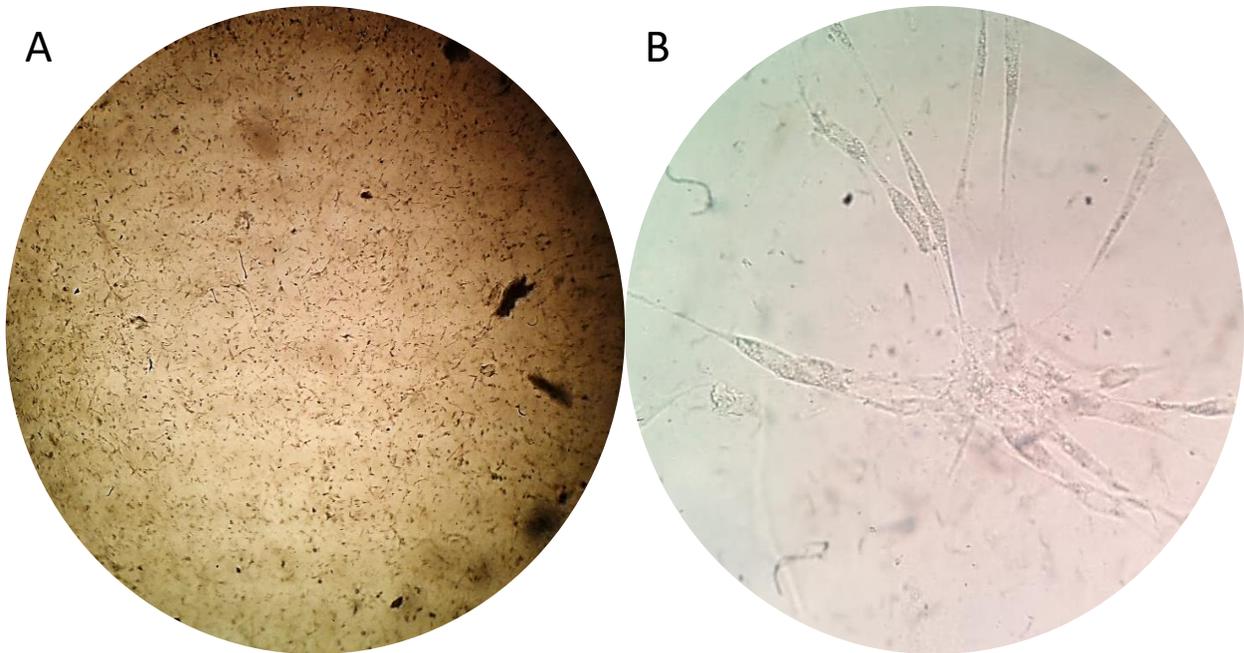


Figura 8. MSC-AD en contacto con hidrogeles de MEC-VU a los 7 días observados al microscopio óptico de campo claro. A) MEC-VU superficie a 4X, B) MEC-VU corte transversal a 10X.

5.2 CORTES HISTOLÓGICOS TEÑIDOS CON H&E

Así mismo a los 7 días de cultivo se evaluó la penetración de las células en los hidrogeles de MEC-OB y MEC-VU. Se realizaron cortes seriados de la muestra de 90 μm y se tiñeron con H&E. En los hidrogeles de MEC-OB las MSC-AD fueron capaces de penetrar hasta una profundidad aproximada de 200 μm (figura 9). Además, se puede observar una gran cantidad de estas células en la superficie de los hidrogeles y como las células penetran de manera ordenada manteniendo su morfología fibroblastoide.

Por otra parte, en los hidrogeles de MEC-VU las MSC-AD fueron capaz de colonizar la superficie del hidrogel y éstas lograron penetrar hasta una profundidad aproximada de 500 μm . Así mismo, estas mantuvieron la morfología fibroblastoide (figura 10).

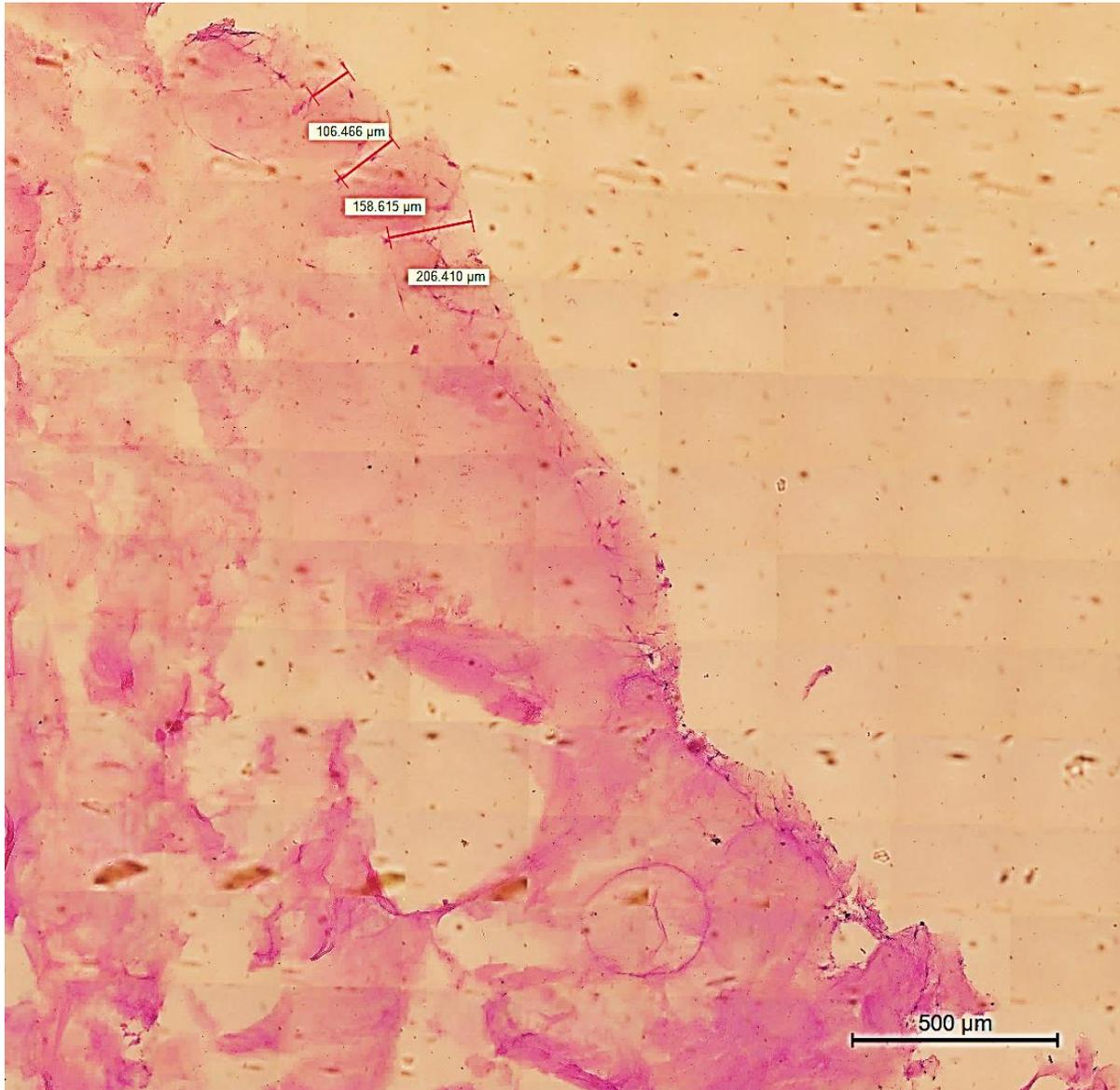


Figura 9. Corte histológico del hidrogel de MEC-OB teñido con H&E a los 7 días de cultivo a 10X. Medición de capacidad de penetración de MSCs en hidrogel de MEC-OB a los 7 días de cultivo.

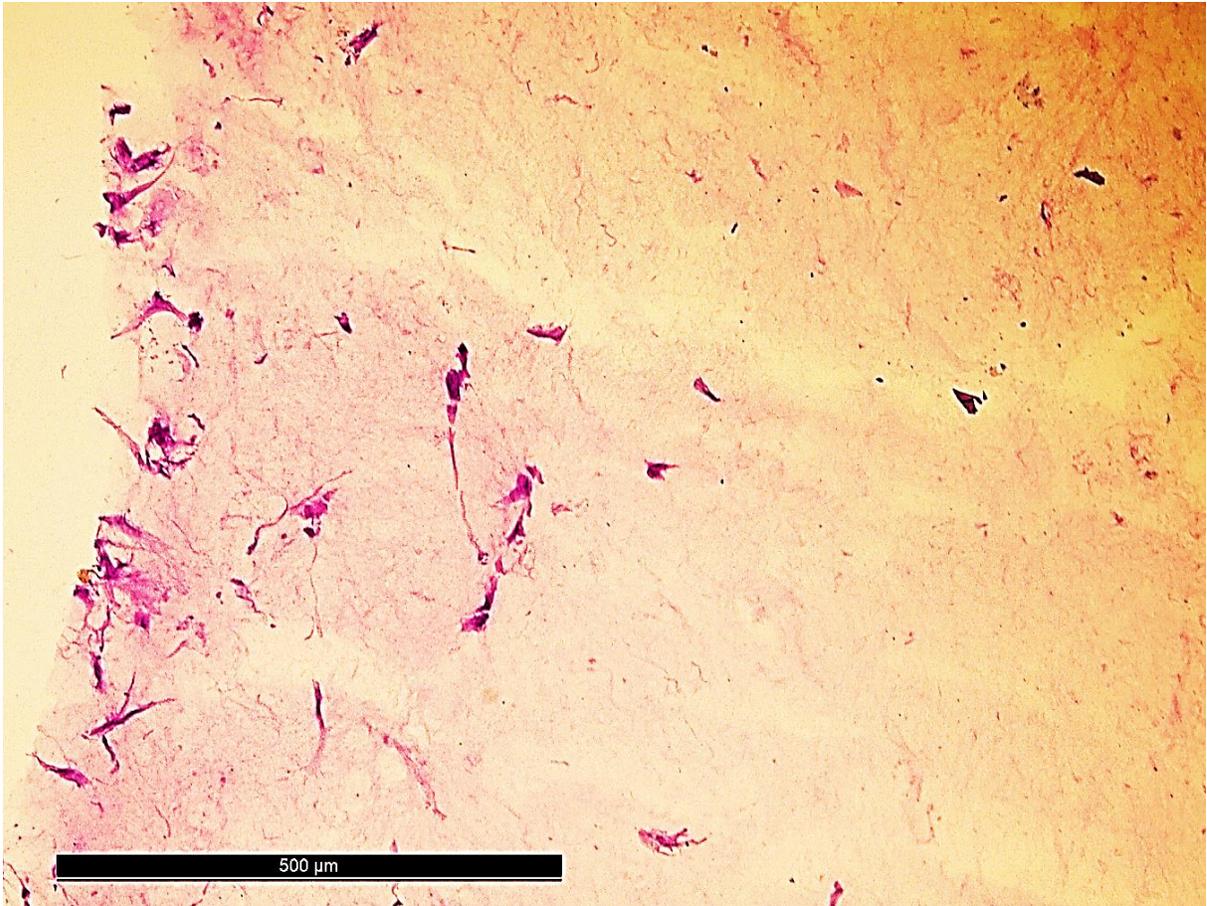


Figura 10. Corte histológico del hidrogel de MEC-VU teñido con H&E a los 7 días de cultivo a 10X. Gran profundidad de penetración de las MSC-AD sobre el hidrogel de MEC-VU.

6 DISCUSIÓN

La búsqueda de un material ideal para la regeneración de tejidos ha generado un interés importante en los investigadores y se ha logrado desarrollar una gran cantidad de materiales con este fin (2); actualmente se buscan estructuras tridimensionales bioactivas, biodegradables y biocompatibles, altamente porosas para dar espacio a las células y facilitar la vascularización del material. Además estos deben de contar con propiedades mecánicas apropiadas para la regeneración del tejido y que éste sea capaz de atraer células al sitio de implante, incorpóralas a su estructura e iniciar una la formación de tejido nuevo (77).

De acuerdo con Young, Ibrahim (58) los andamios naturales obtenidos de órganos de otros animales como ovinos, bovinos o porcinos son más eficientes ya que actualmente se ha demostrado que los andamios a base de polímeros sintéticos enfrentan una reabsorción muy rápida o una capacidad de diferenciación limitada.

Sin embargo, cuando los injertos a emplearse son obtenidos a partir de tejidos estos requieren de la remoción de las células. Silva-Benitez, Soto-Sainz (78), lograron remover el contenido celular de la vejiga de cerdo empleando una combinación de soluciones químicas y enzimáticas mediante inmersión del tejido. En nuestra investigación se utilizó el mismo proceso de descelularización para las MEC, lo cual nos permitió emplear andamios libres de células. Este proceso es crucial para la remoción de las células y de contenido celular. Uno de los principales problemas que surgen al momento de emplear aloinjertos o xenoinjertos es precisamente el desarrollo

del rechazo inmunológico debido al reconocimiento de antígenos extraños en este tipo de andamios ocasionado que estos tengan que ser removidos.

De acuerdo con Soto-Sainz, Silva-Benítez (72), la MEC-VU porcina es un material prometedor para la regeneración de tejido ya que esta matriz es sumamente delgada lo cual facilita su descelularización. Además, a pesar del tratamiento para la remoción celular este mantiene los componentes principales de la MEC, entre ellos el colágeno, elastina, glucosaminoglucanos y componentes que se encuentran adheridos a esta como diversos factores de crecimiento y citocinas que facilitan la adhesión, proliferación y penetración celular en el andamio. Corroborado por diversos autores (34, 49, 51, 53, 79).

Nuestro estudio concuerda con Karamzadeh, Eslaminejad (80), quienes mencionan que es factible utilizar MSC-AD ya que son de más fácil acceso y presentan excelentes características para colonizar los andamios, proliferar y posteriormente especializarse hacia un linaje específico permitiendo la formación de un nuevo tejido. También se ha reportado que las MSCs pueden ser obtenidas de otros tejidos entre ellos de pulpa dental, médula ósea, cordón umbilical, cornea, esófago, cerebro, hígado, etc. mostrando la misma capacidad de proliferación y diferenciación, sin embargo, la obtención de estas células se dificulta ya que se requiere de procedimientos más agresivos, complejos o no se podrían obtener del mismo individuo.

En el estudio realizado por Ma, Yang (74) en el que evaluaron el comportamiento de las MSCs sobre un hidrogel natural y uno sintético, los autores demostraron que el comportamiento celular está influenciado por el tipo de hidrogel, donde se observó que las células cultivadas en el hidrogel natural presentaron mayor capacidad de

proliferación y mejores propiedades osteogénicas, por lo que aunado con nuestros resultados podría hacernos pensar que los hidrogeles de MEC-VU y MEC-OB son andamios que cuentan con las características ideales para ser utilizados en la regeneración de tejidos.

Así mismo, entre los distintos andamios obtenidos de MEC existen diferencias sobre el comportamiento celular. En un estudio realizado por Wolf, Daly (59), se evaluaron hidrogeles de MEC de dermis y de MEC-VU. Estos autores realizaron una evaluación *in vitro* con fibroblastos durante 3 y 7 días, encontrando una mejor penetración de las células en el hidrogel de MEC-VU en comparación con la MEC de dermis. En nuestro estudio las MSC-AD mostraron gran capacidad para penetrar el hidrogel de MEC-VU a los 7 días hasta una profundidad aproximada de 500 μm en comparación con los hidrogeles de MEC-OB donde las células lograron penetrar 200 μm aproximadamente. Al igual que Chen and Thibeault (75) en nuestro estudio no se observaron cambios en cuanto a la morfología o viabilidad celular. Lo que indica que la aplicación de estos hidrogeles puede desempeñar un papel importante en la regeneración de tejidos. Quizá estas diferencias en los resultados de penetración estén dadas por las diferencias entre los componentes proteicos que se pueden encontrar entre los diversos tejidos de donde se obtienen la MEC. Por ejemplo, la MEC-VU está compuesta principalmente por colágeno tipo I, glucosaminoglucanos, heparina, sulfato heparan, sulfato condroitin, ácido hialurónico y colágeno IV y la MEC-OB formada en su mayoría por colágeno tipo I, proteoglucanos, glucoproteínas y colágeno tipo V (53). Tanto la adherencia como la migración celular son procesos necesarios para que se dé el proceso de colonización y penetración de la estructura del andamio. Durante la

adherencia celular se emplean diversas proteínas de anclaje entre las que destacan las integrinas, estas son glucoproteínas transmembrana de la superficie celular que se unen y reconocen una variedad de los componentes de la MEC, así como algunas moléculas de adhesión celular como las proteínas de la familia de las Ig. Estos receptores desencadenan la señalización intracelular al reconocer los componentes de la MEC modificando el comportamiento celular. Por ejemplo, as integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ que reconocen principalmente componentes como la fibronectina e integrinas como $\alpha 2\beta 1$ que reconocen el colágeno. Estas interacciones promueven la tracción que se requiere para la adhesión y migración celular a través de la polimerización de los filamentos de actina (81). Lee, Ishihara (82), describen como el inicio de la migración celular implica la formación prolongaciones citoplasmaticas y la unión al sustrato y como estas interacciones adhesivas generan la tracción y la fuerza necesaria para el movimiento celular. El paso final en el ciclo migratorio requiere de la liberación de adherencias en la parte posterior de la célula, con su posterior desprendimiento y retracción.

Además, para que se dé el proceso migración celular se requiere de una serie de enzimas para degradar la MEC estas son conocidas como metaloproteinasas de matriz, Cascales and Alvarez-Gómez (83), mencionan que la degradación de la MEC ocurre por la intervención de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) como la colagenasa o elastasa, las cuales están implicadas tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Las MMP constituyen una familia de endopeptidasas neutras dependientes de zinc, capaces de degradar los componentes esenciales de la MEC. Estas enzimas se pueden encontrarse unidas a la membrana celular o también pueden

ser secretadas hacia el espacio extracelular y unirse a diversas integrinas, proteínas como CD44, componentes como el heparán sulfato de los proteoglicanos o a el colágeno tipo IV. Quizás debido a que la MEC-VU contiene una mayor cantidad de colágeno tipo IV, permitiendo una mejor interacción entre las MMP de las MSCs y la MEC para su degradación. Además del colágeno tipo IV la MEC-VU contiene en su mayoría elastina lo que permite que las enzimas como la elastasa puedan ser empleadas para la migración celular en comparación con la MEC-OB la cual contiene en su mayoría colágeno tipo I (52, 57).

7 CONCLUSIÓN

Los hidrogeles de MEC-VU y MEC-OB fueron colonizados por MSC-AD brindando el ambiente adecuado para adherirse, colonizar y penetrar. Después de 7 días, se logró mantener morfología fibroblastoide característica de estas células, mostrando ser biocompatible, no provocando efectos citotóxicos y manteniendo viabilidad celular. Por lo tanto, estos andamios de MEC-VU y MEC-OB podrían ser utilizados como sustitutos biológicos para la regeneración de tejidos en futuras investigaciones.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Falke G, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. 2000.
2. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*. 2014;42(2):323-37.
3. Kim Y-K, Kim S-G, Lim S-C, Lee H-J, Yun P-Y. A clinical study on bone formation using a demineralized bone matrix and resorbable membrane. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010;109(6):e6-11.
4. Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. *Injury*. 2011;42(6):609-13.
5. Burchardt H. *The Biology of Bone Graft Repair*. 1983.
6. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006;39(4):678-83.
7. Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal stem cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. 2006.
8. Arévalo-Romero J, Páez-Guerrero D, Rodríguez-Pardo V. Células madre mesenquimales características biológicas. 2007;5.
9. Jaiswal N, Haynesworth S, Caplan A, Bruder S. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro 1997. 295-312 p.
10. Downey P, Siegel M. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. 2006;88.
11. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*. 2015;2015:421746.
12. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.

13. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(2):229-38.
14. Sanchez-Torres A, Sanchez-Garces MA, Gay-Escoda C. Materials and prognostic factors of bone regeneration in periapical surgery: A systematic review. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2014:e419-e25.
15. Dietrich T, Zunker P, Dietrich D, Bernimoulin J-P. Apicomarginal defects in periradicular surgery: Classification and diagnostic aspects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2002;94(2):233-9.
16. Teitelbaum S. Bone Resorption by Osteoclasts. 2000;289.
17. Raspall G. *Cirugía oral e implantología: Médica Panamericana*; 2006.
18. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European Cells and Materials*. 2013;26:120-32.
19. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2014.
20. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-5.
21. Romo E. *Patologia Humana*. 2012.
22. Granero-Molto F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27(8):1887-98.
23. Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *Journal of Dental Reseach*. 2008:107-18.
24. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(5):873-84.

25. Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *International Journal Care Injured*. 2009.
26. E GE, JD LJD, J EJ. Risks factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. 2005. 64-72 p.
27. Whang PG, Wang JC. Bone graft substitutes for spinal fusion. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2003;3(2):155-65.
28. Ahn HH, Kim KS, Lee JH, Lee MS, Song IB, Cho MH, et al. Porcine small intestinal submucosa sheets as a scaffold for human bone marrow stem cells. *International journal of biological macromolecules*. 2007;41(5):590-6.
29. Guo H, Su J, Wei J, Kong H, Liu C. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 2009;5(1):268-78.
30. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, Kim HS, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(24-25):3415-28.
31. Manabe R, Tsutsui K, Yamada T, Kimura M, Nakano I, Shimono C, et al. Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(35):12849-54.
32. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta biomaterialia*. 2009;5(1):1-13.
33. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science (New York, NY)*. 2009;326(5957):1216-9.
34. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue engineering*. 2006;12(3):519-26.

35. Sacks MS, Gloeckner DC. Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of porcine intestinal submucosa. *Journal of biomedical materials research*. 1999;46(1):1-10.
36. Zhang J, Gong JF, Zhang W, Zhu WM, Li JS. Effects of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells on the irradiated intestine of mice. *Journal of biomedical science*. 2008;15(5):585-94.
37. Sellaro TL, Ravindra AK, Stolz DB, Badylak SF. Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds. *Tissue engineering*. 2007;13(9):2301-10.
38. Badylak S, Kokini K, Tullius B, Simmons-Byrd A, Morff R. Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device. *The Journal of surgical research*. 2002;103(2):190-202.
39. Hoshiba T, Lu H, Kawazoe N, Chen G. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert opinion on biological therapy*. 2010;10(12):1717-28.
40. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004;25(13):2679-86.
41. Whitlock PW, Smith TL, Poehling GG, Shilt JS, Van Dyke M. A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon and ligament regeneration. *Biomaterials*. 2007;28(29):4321-9.
42. Bolland F, Korossis S, Wilshaw SP, Ingham E, Fisher J, Kearney JN, et al. Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007;28(6):1061-70.
43. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*. 2008;14(2):213-21.
44. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine*. 2010;16(7):814-20.

45. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nature medicine*. 2010;16(8):927-33.
46. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science (New York, NY)*. 2010;329(5991):538-41.
47. Xiong Y, Wan L. [Preparation and characterization of an extracellular matrix of artificial tendon tissue from natural macromolecules]. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*. 2008;24(11):1907-11.
48. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006;367(9518):1241-6.
49. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002;13(5):377-83.
50. Liu L, Li D, Wang Y, Xu H, Ge L, Liang Z. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic (porcine) extracellular matrix (ECM) scaffold for pelvic reconstruction. *International urogynecology journal*. 2011;22(2):221-7.
51. Farhat WA, Chen J, Haig J, Antoon R, Litman J, Sherman C, et al. Porcine bladder acellular matrix (ACM): protein expression, mechanical properties. *Biomed Mater*. 2008;3(2):025015.
52. Brown BN, Barnes CA, Kasick RT, Michel R, Gilbert TW, Beer-Stolz D, et al. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010;31(3):428-37.
53. Chun SY, Lim GJ, Kwon TG, Kwak EK, Kim BW, Atala A, et al. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials*. 2007;28(29):4251-6.
54. Taga R, Cestari TM, Silva TLd, Stipp ACM. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. *Rev bras implantodontia*. 1997;3(1):13-20.

55. Takano-Yamamoto T, Kawakami M, Sakuda M. Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar cleft for testing bone-inductive agents. 1993.
56. Laureano Filho JR, Castelo Branco BdL, Andrade ESS, Barbosa JRdA. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2007;73:186-92.
57. Lozano YF. Matriz ósea y consolidación. *Medwave*. 2009;9.
58. Young DA, Ibrahim DO, Hu D, Christman KL. Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate. *Acta biomaterialia*. 2011;7(3):1040-9.
59. Wolf MT, Daly KA, Brennan-Pierce EP, Johnson SA, Carruthers CA, D'Amore A, et al. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*. 2012;33(29):7028-38.
60. Quarti A, Nardone S, Colaneri M, Santoro G, Pozzi M. Preliminary experience in the use of an extracellular matrix to repair congenital heart diseases. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2011;13(6):569-72.
61. Nagao RJ, Lundy S, Khaing ZZ, Schmidt CE. Functional characterization of optimized acellular peripheral nerve graft in a rat sciatic nerve injury model. *Neurological research*. 2011;33(6):600-8.
62. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;98(3):538-54.
63. Meirelles LdS. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*. 2009;Volume(14):4281.
64. Hemmat S, Lieberman DM, Most SP. An introduction to stem cell biology. *Facial plastic surgery : FPS*. 2010;26(5):343-9.
65. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendali P, Rice C, Bradley B, Hows JH. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Hematology*. 2003(121):368-74.

66. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology*. 2005;33(11):1402-16.
67. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004;8:301-16.
68. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell W, Katz AJ, et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue engineering*. 2001;7.
69. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells, tissues, organs*. 2003;174(3):101-9.
70. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(5):1294-301.
71. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Current opinion in pharmacology*. 2006;6(4):435-41.
72. Soto-Sainz JE, Silva-Benítez EL, Romero-Quintana JG, Pozos-Guillen AJ, Aguilar-Medina EM, Ayala-Ham AR, et al. Synthesis and biofunctionalization of extracellular matrix hidrogel for bone regeneration. *Dental Materials*. 2016;32:e31.
73. Fernandes LF, Costa MA, Fernandes MH, Tomas H. Osteoblastic behavior of human bone marrow cells cultured over adsorbed collagen layer, over surface of collagen gels, and inside collagen gels. *Connective tissue research*. 2009;50(5):336-46.
74. Ma J, Yang F, Both SK, Kersten-Niessen M, Bongio M, Pan J, et al. Comparison of cell-loading methods in hydrogel systems. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2014;102(4):935-46.

75. Chen X, Thibeault SL. Cell-cell interaction between vocal fold fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells in three-dimensional hyaluronan hydrogel. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2016;10(5):437-46.
76. Muñoz-Ruiz A, Silva-Benitez E, Soto-Sainz E, Cerda-Cristerna B, Ortiz-Magdaleno M, Pozos-Guillen A, et al. Evaluation of Descellularized Matrix and B-Tricalcium Phosphate as Biomaterials for Bone Neoformation. In vivo study. *International Journal Morphology*. 2017;3:804-11.
77. Benders KE, van Weeren PR, Badylak SF, Saris DB, Dhert WJ, Malda J. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends in biotechnology*. 2013;31(3):169-76.
78. Silva-Benitez E, Soto-Sainz E, Pozos-Guillen A, Romero-Quintana JG, Aguilar-Medina M, Ayala-Ham A, et al. Quantification of DNA in urinary porcine bladder matrix using the ACTB gene. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2015;51(10):1040-6.
79. Gilbert TW. Strategies for tissue and organ decellularization. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(7):2217-22.
80. Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(69).
81. Huttenlocher A, Sandborg R, Horwitz A. Adhesion in cell migration. *Current Biology*. 1995;7:697-706.
82. Lee J, Ishihara A, Jacobson K. How do cells move along surfaces? *Trends Cells Biology*. 1993;3:366-70.
83. Cascales M, Alvarez-Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cancer. 2010;76:59-84.