



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Biología**  
**Doctorado en Ciencias Biológicas**



**PROYECTO DE TESIS DOCTORAL**

**Evaluación del potencial regenerativo de un hidrogel  
de matriz extracelular sobre defectos óseos orales**

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MC. Germán Reynaldo Jiménez Gastélum**

DIRECTORES DE TESIS

**Dra. Erika de Lourdes Silva Benítez**

**Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina**

ASESORES

**Dr. León Fráncico Cristóbal Espinoza**

**Dra. Carmen Lucía Moraila Martínez**

Culiacán, Sinaloa; México, 28 de junio de 2022



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Enfermedad periodontal .....	1
1.2 Patogénesis inmunomicrobiológica .....	2
1.3 Tejido óseo .....	3
1.4 Mecanismos de remodelación ósea .....	4
1.5 Mecanismos inmunológicos que conllevan a la degradación de los tejidos de sostén de los órganos dentarios .....	5
1.6 Opciones terapéuticas .....	7
II. ANTECEDENTES .....	11
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
IV. JUSTIFICACIÓN .....	14
V. HIPÓTESIS .....	15
VI. OBJETIVOS .....	16
6.1 Objetivo general .....	16
6.2 Objetivos específicos .....	16
VII. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	17
7.1 Tipo de estudio .....	17
7.2 Localización .....	18
7.4 Diseño experimental .....	19
7.4.1 Esquema general del flujo de trabajo .....	19
7.4.2 Esquema de la preparación de los medios condicionados y las líneas celulares a evaluar. 20	20
7.4.3 Esquema para el análisis de proliferación y citotoxicidad con sales de tetrazolio. ..	21
7.4.4 Esquema para el análisis de la viabilidad celular mediante fluorescencia .....	22
7.4.5 Esquema para el análisis de cuantificación de citocinas .....	23
7.4.6 Cultivos 3D con MSCs sobre los hidrogeles de MEC .....	24
7.4.7 Biocompatibilidad <i>in vivo</i> .....	25
7.4.8 Esquema del modelo regenerativo <i>in vivo</i> .....	26
7.4.9 Esquema para el análisis antibacteriano .....	27
VIII. METODOLOGÍA .....	28
8.1 Preparación y caracterización de las NPs Ag .....	28

8.2	Preparación de la vejiga porcina .....	28
8.3	Proceso de descelularización por inmersión.....	29
8.4	Digestión, gelificación y funcionalización.....	29
8.5	Determinación de presencia de colágeno del hidrogel a través de SDS-PAGE.....	29
8.6	Cuantificación de colágeno de los pregeles de MEC de vejiga porcina .....	30
8.7	Preparación de medios condicionados .....	31
8.8	Cultivo celular.....	31
8.9	Ensayos de citotoxicidad y proliferación celular .....	32
8.10	Ensayos de viabilidad celular mediante fluorescencia.....	33
8.11	Ensayos de análisis de expresión de citocinas .....	33
8.12	Ensayos de cultivos 3D con MSCs sobre los hidrogeles de MEC.....	34
8.13	Ensayos de biocompatibilidad <i>in vivo</i> .....	35
8.14	Ensayos de actividad antibacteriana de concentración mínima inhibitoria .....	35
8.15	Modelo experimental regenerativo <i>in vivo</i> .....	36
8.16	Análisis estadístico .....	37
8.17	Cuidado y manejo de los animales.....	37
IX.	RESULTADOS .....	39
9.1	Síntesis de nanopartículas de plata.....	39
9.2	Obtención de un hidrogel de MEC de vejiga de cerdo descelularizada.....	40
9.3	Concentraciones de colágena en la MEC de vejiga de cerdo.....	42
9.4	La MEC de vejiga de cerdo contiene principalmente proteínas de colágeno tipo I.....	43
9.5	Biocompatibilidad celular con extractos de MEC.....	44
9.6	Activación de M $\phi$ con extractos de MEC.....	56
9.7	Obtención de hidrogeles de MEC.....	59
9.8	Adherencia e infiltración celular en hidrogeles de MEC.....	61
9.9	Análisis de la biocompatibilidad <i>in vivo</i> .....	71
9.10	Análisis del modelo <i>in vivo</i> en ratas Wistar.....	75
9.11	Análisis de los ensayos de actividad antibacteriana .....	82
X.	DISCUSIÓN.....	85
XI.	CONCLUSIONES .....	93
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	95
XIII.	ANEXOS .....	99
	Anexo 1 Procedimiento ensayo de MTT .....	99

Anexo 2. Procedimiento del ensayo de vida y muerte .....	99
Anexo 3 Procedimiento ensayo de LDH .....	100
Anexo 4. Procedimiento cortes histológicos en criostato.....	101
Anexo 5. Procedimiento tinción hematoxilina & eosina.....	101

## RESUMEN

La ingeniería de tejidos es un campo donde se aplican los conocimientos de las ciencias biológicas y de los materiales para diseñar y producir tejidos funcionales, en condiciones *in vitro*, a través del uso de estructuras físicas 3D conocidas como andamios. Actualmente, estos andamios se pueden producir a partir de matriz extracelular (MEC) ya que éstas están constituidas por proteínas, proteoglicanos y factores de crecimiento que le confieren a la célula estímulos necesarios para la adherencia y supervivencia. Sin embargo, en procesos infecciosos como la periodontitis la regeneración no se logra concretar debido a la inflamación producida por el proceso infeccioso.

Ante esta circunstancia esta investigación pretende evaluar la capacidad antibacteriana y regenerativa de un andamio de MEC, así como también la funcionalización de este con nanopartículas de plata (NPs Ag).

Para ello, se preparó un hidrogel de MEC a partir de vejiga urinaria porcina a una concentración de 20 mg/ml y se sintetizaron las NPs Ag con un tamaño promedio de 5.8 nm. Para evaluar la capacidad antibacteriana se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria y de inhibición radial con *Enterococcus faecalis* y su biocompatibilidad con células mediante análisis de actividad metabólica, citotoxicidad y viabilidad celular, ensayos de adhesión y penetración celular. Además para evaluar la capacidad regenerativa se estandarizó un modelo *in vivo* con ratas Wistar, produciéndoles un defecto óseo en el maxilar de

aproximadamente 2mm, sobre el cual posteriormente se colocaron los andamios y se contaminaron deliberadamente con bacterias o lipopolisacárido (LPS).

De acuerdo a los resultados de los ensayos de biocompatibilidad se pudo corroborar que los hidrogeles de MEC no producen citotoxicidad y permiten el despliegue de la morfología celular típica sin comprometer la viabilidad celular, incluso se pudo registrar que la actividad metabólica celular se vio alterada de manera positiva. Además, los ensayos de cultivo 3D muestran que las células son capaces de adherirse a la superficie del hidrogel y penetrar aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  dentro del hidrogel. Por su parte, los hidrogeles con NPs Ag presentaron un ligero efecto negativo en la citotoxicidad y viabilidad celular, así como también impidieron que se obtuvieran resultados de los cultivos 3D y de los ensayos de regeneración. Por su parte los hidrogeles sin funcionalizar permitieron el proceso regenerativo en condiciones infecciosas. Así mismo, los análisis de biocompatibilidad *in vivo* no mostraron diferencias en el tipo de infiltrado leucocitario presente en ambos hidrogeles. Por último, se pudo determinar que los hidrogeles de MEC con NPs Ag presentaron un ligero efecto inhibitorio contra *Enterococcus faecalis*.

Los hidrogeles de MEC de vejiga de cerdo son biocompatibles, son estructuras funcionales para el soporte de la célula y posibilitan la regeneración en condiciones de contaminación bacteriana. Por último, creemos que la funcionalización de los hidrogeles con NPs Ag no es recomendable, a pesar de su efecto antibacteriano.

## ABSTRACT

Tissue engineering is a field where biological and materials science knowledge is applied to design and produce functional tissues, under *in vitro* conditions, through the use of 3D physical structures known as scaffolds. Currently, these scaffolds can be produced from the extracellular matrix (ECM) giving the cell the necessary stimuli for adherence and survival since these are made up of proteins, proteoglycans and growth factors. However, in infectious processes such as periodontitis, regeneration is not achieved due to the inflammation produced by the infectious process.

Given this circumstance, this research intends to evaluate the antibacterial and regenerative capacity of an ECM scaffold, as well as its functionalization with silver nanoparticles (Ag NPs).

For this, an ECM hydrogel was prepared from porcine urinary bladder at a concentration of 20 mg/ml and Ag NPs with an average size of 5.8 nm were synthesized. To evaluate the antibacterial capacity, minimum inhibitory concentration and radial inhibition tests were carried out with *Enterococcus faecalis* and its biocompatibility with cells by analyzing metabolic activity, cytotoxicity and cell viability, cell adhesion and penetration tests. In addition, to evaluate the regenerative capacity, an *in vivo* model with Wistar rats was standardized, producing a bone defect in the maxilla of approximately 2mm, on which the

scaffolds will later be placed and deliberately contaminated with bacteria or lipopolysaccharide (LPS).

According to the results of the biocompatibility tests, it was possible to corroborate that the ECM hydrogels do not produce cytotoxicity and allow the display of the typical cell morphology without compromising cell viability, even more it was possible to record that the cellular metabolic activity was positively altered. Furthermore, 3D culture assays show that the cells are capable of adhering to the hydrogel surface and penetrating approximately 500  $\mu\text{m}$  into the hydrogel. On the other hand, the hydrogels with Ag NPs presented a slight negative effect on cytotoxicity and cell viability, as well as preventing the results of 3D cultures and regeneration assays from being obtained. On the other hand, non-functionalized hydrogels allowed the regenerative process under infectious conditions. Likewise, *in vivo* biocompatibility analyzes did not show differences in the type of leukocyte infiltrate present in both hydrogels. Finally, it was possible to determine that the ECM hydrogels with Ag NPs presented a slight inhibitory effect against *Enterococcus faecalis*.

Pig bladder ECM hydrogels are biocompatible functional structures for cell support and enable regeneration under conditions of bacterial contamination. Finally, we believe that the functionalization of hydrogels with Ag NPs is not recommended, despite their antibacterial effect.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es un padecimiento que afecta las estructuras de soporte del diente. Se caracteriza por presentar inflamación de la encía, formación de bolsas periodontales, reabsorción ósea y pérdida de inserción (Worch, Listgarten, & Korostoff, 2001). Esta enfermedad afecta principalmente a adultos mayores (Eke et al., 2015), aunque también se puede presentar en niños, adolescentes y jóvenes adultos (Loe & Brown, 1991).

Existen diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad periodontal, por lo que la Academia Americana de Periodoncia clasifica la enfermedad periodontal en 8 categorías (Armitage, 2008): gingivitis, periodontitis crónica, periodontitis agresiva, periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas, enfermedad periodontal necrotizante, abscesos del periodonto, periodontitis asociada a lesiones endodónticas y condiciones o deformidades del desarrollo o adquiridas. De esta clasificación la gingivitis y la periodontitis crónica se presentan con mayor frecuencia.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre un 85% y un 95 % de la población mundial presentan algún tipo de enfermedad periodontal. En los Estados Unidos de América se estima que alrededor del 50% de los adultos presenta gingivitis (Sawkins et al., 2013), mientras que alrededor de un 46%

desarrolla periodontitis, incrementándose esta cifra hasta un 63.2% en población hispana (Eke et al., 2015). En nuestro país, los resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Orales difundido por la Secretaría de Salud, indica que en población adulta, solo un 43.2% presenta un periodonto sano, un 52.1% gingivitis y un 4.7% periodontitis (SIVEPAB 2015).

El diagnóstico de la periodontitis se basa principalmente en la inspección visual de la encía evaluando el grado de inflamación, además se hace uso de una sonda periodontal para medir la profundidad de las bolsas periodontales determinando el nivel clínico de inserción. De acuerdo con los criterios establecidos por Machtei y *col.* (Machtei et al., 1992), para el establecimiento de la entidad clínica de la periodontitis crónica se debe presentar inflamación severa de la encía, una pérdida de inserción  $\geq 6$  mm en dos o más dientes y bolsas periodontales  $\geq 4$  mm de profundidad en uno o más sitios. Además como prueba diagnóstica de refuerzo se suele emplear la evaluación radiográfica para determinar el nivel de degradación del tejido óseo (Worch et al., 2001).

## **1.2 Patogénesis inmunomicrobiológica**

En la mayoría de los casos el desarrollo de la enfermedad periodontal es de origen microbiológico, se sabe que una dieta rica en azúcares promueve la adherencia de una gran cantidad de bacterias Gram positivas, aerobias y facultativas al esmalte dental permitiendo la formación de la placa dentobacteriana. Si ésta se localiza por encima de la encía se le denomina placa supragingival y si la placa se encuentra

por debajo del margen gingival se denomina placa subgingival. Al existir falta de higiene oral como no usar enjuague ni hilo dental, no lavarse los dientes o lavárselos solo 1 vez al día, así como no frecuentar el uso de servicios dentales la placa supragingival se extiende hacia el surco gingival donde existe una presencia baja de oxígeno permitiendo que aumente la proporción de bacterias Gram negativas, facultativas y anaerobias (Loesche, 2007).

La placa supragingival está compuesta principalmente por bacterias comensales, mientras que la placa subgingival está compuesta por bacterias “proinflamatorias” y “esenciales” para la desregulación del sistema inmunológico, las cuales son clave en el desarrollo de la periodontitis. Hoy se sabe que estas bacterias actúan en sinergia y ocasionan un desbalance en la composición de la placa dental promoviendo el proceso inflamatorio provocando la formación de bolsas periodontales y degradación ósea con la consecuente pérdida del órgano dental. Entre las principales bacterias relacionadas con la periodontitis se encuentran bacterias consideradas patógenos periodontales como: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythus*, *Treponema denticola* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (George Hajishengallis, 2015), las cuales son capaces de invadir las células epiteliales e inmunológicas de la encía desencadenando daño al tejido gingival y promoviendo la degradación del tejido óseo.

### **1.3 Tejido óseo**

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo compuesto de matriz extracelular (MEC) capaz de mineralizarse y formar tejido duro para sostén y protección. Este proceso de mineralización solo se puede llevar a cabo mediante la deposición de MEC, y la subsecuente formación de cristales de hidroxapatita a través del establecimiento de una serie de condiciones químicas y enzimáticas donde participa la fosfatasa alcalina.

Entre los principales componentes de la MEC ósea se encuentran el colágeno tipo I, II, IV, XI y XIII constituyendo alrededor de un 90% de las proteínas. Además, podemos encontrar proteoglicanos, osteonectina, osteopontina, osteocalcina y una diversidad de factores de crecimiento y citocinas como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IGF-1 y BMPs, las cuales contribuyen a procesos de remodelación ósea mediante la degradación y formación de hueso.

#### **1.4 Mecanismos de remodelación ósea**

El cuerpo humano cuenta con mecanismos que le permiten remodelar la estructura ósea. El hueso es un tejido dinámico donde las fibras estructurales de la MEC son degradadas y reconstruidas constantemente por diversas células que requieren moverse a través de la estructura tridimensional o posicionarse en el sitio donde se requieran. Para ello células especializadas como osteoclastos y osteoblastos, se encargan de llevar a cabo la remodelación ósea a través de procesos de degradación y síntesis de la MEC, respectivamente. En el desarrollo de este tipo de células participan 2 linajes celulares: uno de origen hematopoyético

y otro de origen mesenquimal. Se sabe que las células madre mesenquimales (MSCs) bajo la activación de diversas vías de señalización celular, entre ellas la de Runx2, se diferencian a osteoblastos, mientras que las células madre hematopoyética tras el reconocimiento de RANKL se diferencia hacia osteoclastos (Arboleya & Castañeda, 2013).

En estado de homeostasis, la remodelación ósea comienza con el posicionamiento de los osteoclastos en el área donde se producirá la resorción de tejido. Al iniciar la degradación del tejido se liberan diversas proteasas conformando un deformidad cóncava conocida como laguna de Howship, en una etapa posterior la zona donde se llevó a cabo la resorción ósea es repoblada por células de revestimiento y por osteoblastos. Una de las funciones principales de estas células es la secreción de MEC y contribuyen a su posterior mineralización a través de reacciones enzimáticas por parte de la fosfatasa alcalina que conllevan a la incorporación de iones de calcio y fosfato a la MEC, asimismo son capaces de mediar la degradación del hueso a través de la secreción de citocinas que estimulan la maduración del precursor de osteoclastos (Arboleya & Castañeda, 2013).

### **1.5 Mecanismos inmunológicos que conllevan a la degradación de los tejidos de sostén de los órganos dentarios**

Al parecer, la destrucción del tejido óseo se debe principalmente a la actividad migratoria excesiva de los neutrófilos hacia el sitio de la infección. Para abrirse paso entre el tejido gingival los leucocitos emplean diversas metalproteinasas de

matriz (MPP) para degradar las proteínas estructurales de la MEC como el colágeno y la elastina. Algunos estudios inmunohistoquímicos han demostrado que en los pacientes con gingivitis y periodontitis se pueden encontrar incrementos en las concentraciones de MPP7 y MPP3 (Kurtulus Waschulewski et al., 2016).

El incremento en la cantidad de células del sistema inmunológico se debe principalmente a la interacción hospedero-patógeno que reconoce los microorganismos de la placa dental y a la evasión inmunitaria donde las bacterias comienzan a invadir células epiteliales de la encía. Sin embargo, el reclutamiento de neutrófilos hacia el surco gingival en los individuos con periodontitis falla en controlar la microbiota en disbiosis, impidiendo detener la programación de la infección donde las bacterias consideradas angulares en el desarrollo de la enfermedad, logran llegar hasta la MEC donde interaccionan con células del sistema inmunológico como macrófagos, células dendríticas y linfocitos  $\gamma\delta$ . En procesos infecciosos como la periodontitis el balance entre la formación y degradación de tejido óseo se pierde debido a que estas células promueven una alta liberación de RANKL e IL-17. RANKL es una citocina crucial en la diferenciación del precursor de osteoclastos en una célula activa, ósea en un osteoclasto maduro cuya función es la degradación del hueso alveolar (G. Hajishengallis, 2014).

La degradación del hueso conlleva a la pérdida de la pieza dental y a una disminución en la calidad de vida de los individuos con periodontitis a medida que se profundiza la severidad de este padecimiento, incluso llegando a desarrollar

diversas enfermedades sistémicas (Ferreira, Dias-Pereira, Branco-de-Almeida, Martins, & Paiva, 2017).

## **1.6 Opciones terapéuticas**

El tratamiento que se le ofrece a los pacientes con periodontitis es el raspado y alisado, el cual consiste en remover la placa dental, cálculos dentales y el tejido necrótico. Sin embargo, mediante el empleo de este método no es posible remover por completo las bacterias, por lo que se acompaña con el uso de fármacos antibacterianos con la intención de coadyuvar el tratamiento mecánico, sin embargo, la degradación ósea no logra recuperarse. En el mejor de los casos se puede controlar la infección y se lleva a cabo la cicatrización del tejido.

De esta manera, han surgido una diversidad de opciones regenerativas, entre ellas el empleo del plasma rico en plaquetas debido a componentes como la fibrina que forman estructuras tridimensionales que sirven como sostén y anclaje para las células, también proporcionando una diversidad de factores de crecimiento los cuales promueven el proceso de diferenciación tisular de células madre, la proliferación y el crecimiento celular. Sin embargo, las mejoras con respecto al tratamiento convencional no son significativas (Jalaluddin et al., 2017).

Desde el campo de la ingeniería tisular se ha intentado resolver los problemas de pérdida ósea. Ésta es una ciencia que intenta la reconstrucción de tejidos mediante el uso de estructuras 3D conocidos como andamios para la producción de tejidos *in vitro*. Los materiales con los cuales se pueden preparar incluyen las cerámicas como fosfato tricálcico y la hidroxiapatita (Amalakara et al., 2017), polímeros sintéticos como el ácido poliláctico glicólico, proteínas como la colágena (Irokawa et al., 2017) , la fibronectina y glucosaminoglucanos como el ácido hialurónico. Actualmente, los andamios también pueden ser producidos a partir de MEC de tejidos como el intestino delgado, hígado, hueso, pulpa dental, dentina, vejiga urinaria, entre otros tejidos donde exista MEC (Kim, Kim, Lim, Lee, & Yun, 2010).

Entre las ventajas que presentan los andamios de MEC es que están constituidos por los mismos compuestos del entorno natural de la célula: proteínas, carbohidratos y factores de crecimiento que le confieren a la célula los estímulos necesarios para la adherencia, sobrevivencia, migración, proliferación, diferenciación y la ejecución de funciones especializadas. Incluso, se ha documentado que los componentes derivados de la degradación de la MEC poseen capacidades antibacterianas actuando en contra de una amplia gama de bacterias tanto Gram positivas como negativas. Al parecer el efecto biológico está dado por péptidos que poseen regiones de su estructura proteica compuestas de secuencias de aminoácidos hidrofóbicos y básicos que conforman regiones catiónicas con alta afinidad por la membrana de las bacterias (Naqvi et al., 2017).

Se ha reportado que la incorporación de componentes como el fosfato tricálcico o hidroxiapatita a la MEC también son capaces de reducir la proporción de bacterias patogénicas y aumentar la proporción de bacterias comensales en la placa dental (Queiroz et al., 2017). Por ello es importante que los andamios que se empleen para la regeneración tisular en condiciones de infección presenten propiedades microbicidas y permitan la regeneración del tejido óseo.

Las NPs Ag son agentes antibacterianos de amplio espectro (Jayaprakash, Judith Vijaya, John Kennedy, Priadharsini, & Palani, 2015). Se sabe que el uso de NPs Ag, a bajas concentraciones, no ocasiona citotoxicidad ni induce la producción de especies reactivas de oxígeno en estudios con células eucariotas (Song et al., 2014).

Por su parte, debido a las propiedades de absorción de los hidrogeles, éstos son empleados como sistemas de liberación de drogas. Al funcionalizar los hidrogeles con NPs Ag se obtiene la capacidad de liberación gradual de la plata y se proporciona estabilidad al hidrogel (Garcia-Astrain et al., 2015) manteniendo la actividad antibacteriana de las NPs Ag (Thomas, Yallapu, Sreedhar, & Bajpai, 2007).

Los estudios de biocompatibilidad realizados con andamios de MEC en forma de hidrogel indican que los procesos regenerativos se llevan a cabo mucho más rápido debido a que son materiales de fácil colonización celular debido a su estado físico, además de no perder el contenido de una gamma de factores de

crecimiento presentes en su constitución natural del tejido tras el procedimiento para la obtención de hidrogeles [21]. De estos andamios de MEC, los hidrogeles de vejiga porcina descelularizada han demostrado ser apropiados para la proliferación celular sobre ellos, funcionando como andamios naturales para la célula [22].

Debido a lo anterior, creemos que el empleo de hidrogeles de vejiga porcina mejorará la regeneración ósea y evitará la contaminación con bacterias, y la funcionalización con NPs Ag potencializará sus efectos sobre la inhibición bacteriana.

## II. ANTECEDENTES

Durante los últimos años del siglo 20 e inicios del siglo 21 la investigación en el área de la ingeniería de tejidos ha conllevado al desarrollo de materiales cada vez más apropiados que permiten una mejor interacción con las células lo que deriva en el proceso regenerativo (Sculean et al., 2015). Se ha demostrado que los andamios de MEC destacan por poseer características únicas para la interacción y el establecimiento de las células. Cada una de las proteínas constituyentes de la MEC presentan una diversidad de dominios estructurales que le permiten a la célula establecer la adherencia a través de proteínas transmembrana y modular la respuesta celular ("Chapter 7 - Cell Adhesion and the Extracellular Matrix," 2021). Andamios elaborados de MEC de la dermis, plasma sanguíneo, submucosa de intestino delgado y vejiga urinaria son capaces de permitir la colonización celular en estudios *in vitro* (Giraldo-Gomez et al., 2016). También se ha demostrado que la funcionalización de hidrogeles de colágeno tipo I con NPs Ag no impiden que lleve a cabo el proceso de adherencia celular manteniendo su funcionalidad como andamio (Garcia-Astrain et al., 2015).

Por su parte, en los estudios *In vivo* se ha evaluado la capacidad regenerativa de la MEC sobre diversos tipos de lesiones demostrando las ventajas del empleo de los andamios de MEC al lograr restaurar el tejido manteniendo su funcionalidad (Badylak et al., 1995), incluso en condiciones experimentales adversas adecuando las condiciones para el desarrollo de un proceso infeccioso (Chen et al., 2019).

En nuestro grupo de trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de un proceso para la obtención de MEC liofilizada de vejiga de cerdo libre de células (Silva-Benitez et al., 2015). Este material obtenido fue evaluado en la regeneración tisular de defectos óseos demostrando que a las 4 y 8 semanas tras la colocación del implante se pudo observar neo formación de tejido tipo óseo y tejido tipo cartilaginoso (Muñoz-Ruíz et al., 2017). También se ha logrado procesar este material para preparación de hidrogeles de manera exitosa a través de la digestión enzimática de la MEC (Soto-Sainz et al., 2016).

En este estudio se evaluaron los efectos derivados de la incorporación de NPs de Ag a hidrogeles de MEC de vejiga de cerdo tanto *in vitro* como *in vivo*. También se evaluó el potencial antibacteriano y la capacidad de regeneración ósea en condiciones de contaminación bacteriana de los hidrogeles de MEC y de los hidrogeles funcionalizados con NPs Ag.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los diversos tratamientos periodontales buscan reducir los efectos fisiopatológicos derivados de la inflamación de los tejidos de sostén de los órganos dentarios, sin embargo, los tratamientos convencionales no logran eliminar la infección en su totalidad y la regeneración de la zona dañada es limitada.

Se ha demostrado que el empleo de andamios como estructuras 3D permiten el repoblamiento celular y de esta manera se potencializa la formación de nuevo tejido óseo en diversos modelos biológicos. Sin embargo, la estimulación continúa del sistema inmunológico debido a la presencia de bacterias en la zona de la lesión dificultan el proceso regenerativo, por lo tanto, la funcionalización de la MEC con un agente con propiedades antibacterianas surge como propuesta para intentar resolver el problema. Considerando que las NPs Ag presentan un amplio espectro bactericida y generan poca resistencia, éstas representan una opción prometedora. De acuerdo con la bibliografía consultada, el enriquecimiento de la MEC de vejiga con NPs Ag no se ha sido reportado y se desconocen los posibles efectos que ello pudiera implicar, por lo que nuestro grupo de investigación se plantea la siguiente pregunta:

¿Una MEC enriquecida con NPs Ag será capaz de potencializar la regeneración ósea y a su vez contar con propiedades antibacterianas?

## IV. JUSTIFICACIÓN

Más allá de la degradación del hueso y la pérdida del órgano dentario, los pacientes que presentan enfermedad periodontal crónica se exponen al desarrollo de una serie de enfermedades sistémicas como la diabetes, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares y en las mujeres embarazadas se pueden presentar nacimientos de neonatos prematuros y de bajo peso, incluyendo todas las desventajas que ello conlleva [7].

Así mismo, el impacto económico y emocional en los individuos que sufren periodontitis, disminuye su calidad de vida a medida que se profundiza la severidad de este padecimiento (Ferreira et al., 2017). Por ello, creemos que la innovación en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas es necesaria para ayudar a disminuir los impactos adversos que se presentan.

En este estudio se evaluó una nueva opción terapéutica que busca mejorar las capacidades de regeneración del tejido óseo bajo procesos infecciosos para así mantener la funcionalidad y estética del aparato estomatognático.

Hasta el momento, de acuerdo a la bibliografía consultada, no hemos encontrado reportes del uso de hidrogeles de MEC funcionalizados con nanopartículas de plata, por lo que al considerar las propiedades de ambos materiales nos resulta interesante evaluar su eficiencia.

## **V. HIPÓTESIS**

El hidrogel de MEC con NPs Ag presenta actividad antibacteriana, es biocompatible y promueve la regeneración tisular ósea.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Determinar el efecto antibacteriano, biocompatible y regenerativo de un hidrogel de MEC de vejiga porcina con NPs Ag.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Examinar la capacidad antibacteriana de los hidrogeles.
2. Evaluar la biocompatibilidad celular de los hidrogeles *in vitro*.
3. Evaluar la biocompatibilidad y capacidad regenerativa de los hidrogeles *in vivo*.

## **VII. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

### **7.1 Tipo de estudio**

Esta es una investigación perteneciente a las ciencias aplicadas dentro del área de la biotecnología, campo de la medicina regenerativa, en la disciplina de la ingeniería tisular. Este estudio empleará un enfoque cuantitativo y descriptivo con un diseño de investigación experimental con posprueba y grupo control. Los experimentos se realizaron por triplicado para obtener reproducibilidad en las pruebas.

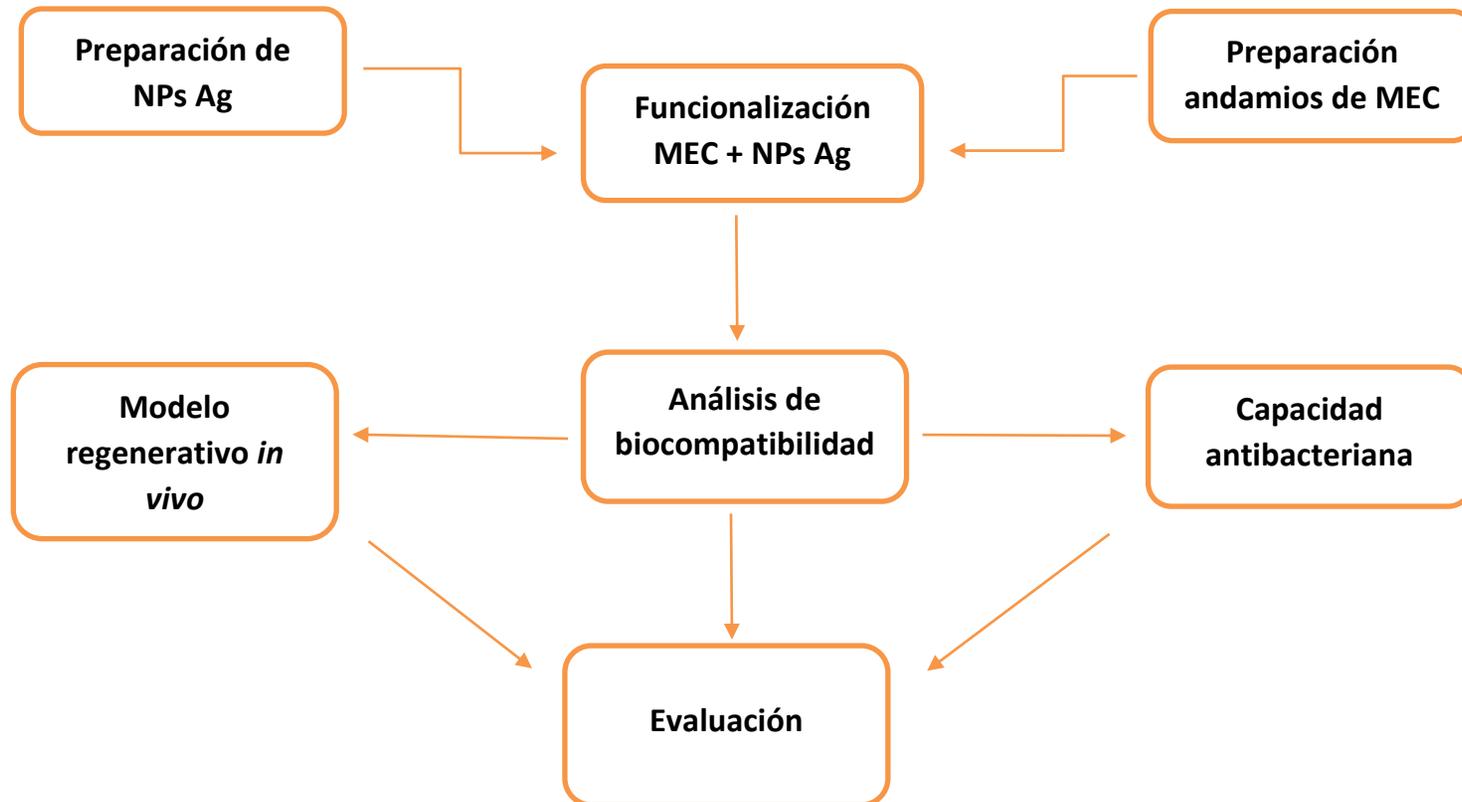
## **7.2 Localización**

Este estudio se realizó mediante un esfuerzo multidisciplinario por lo tanto las diversas técnicas y métodos se llevaron a cabo en distintos laboratorios de investigación.

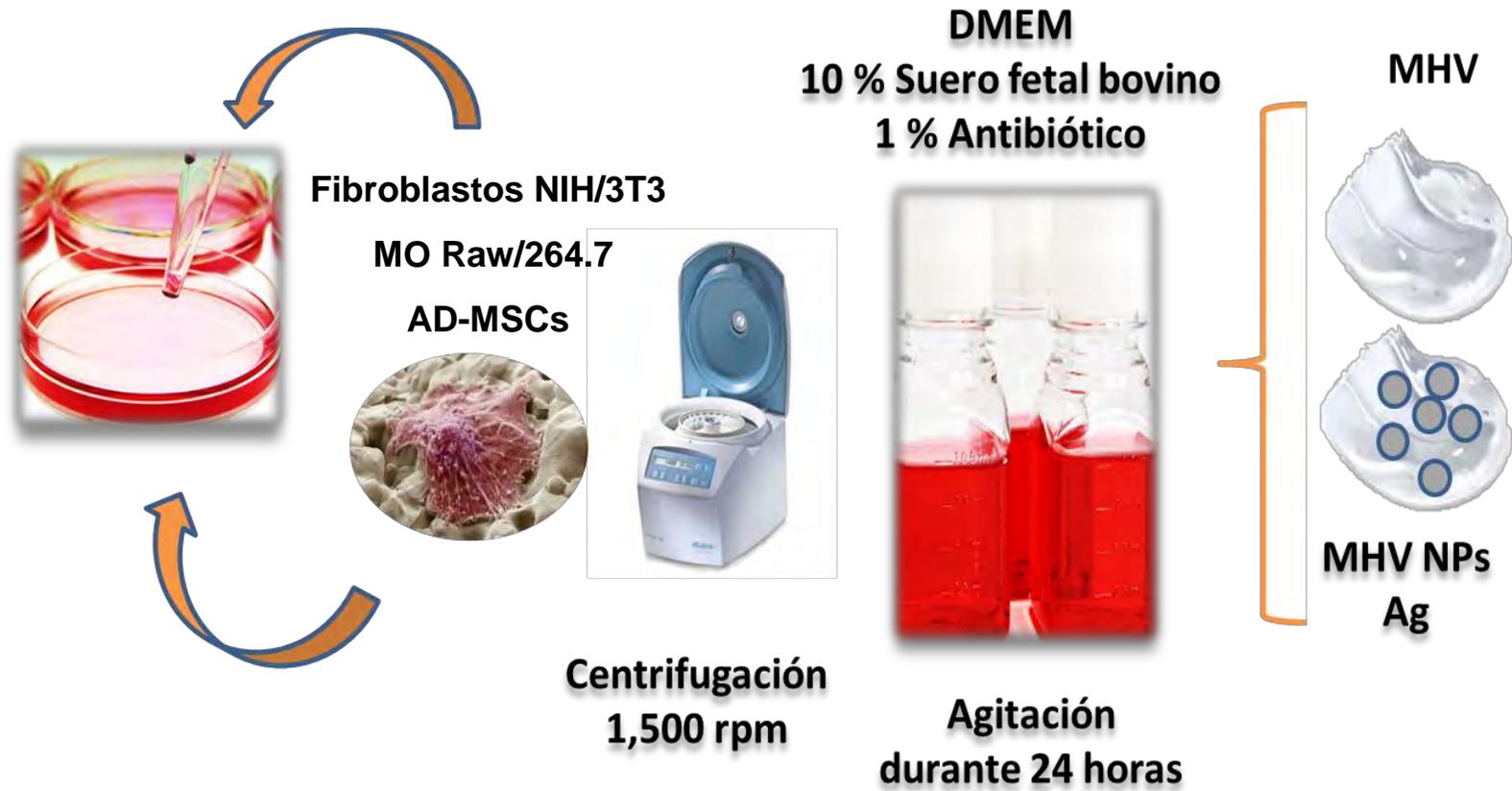
Las NPs Ag se sintetizaron en el laboratorio de Microbiología Bucal en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). Mientras que la obtención de la MEC y los experimentos se realizaron en los laboratorios de Microbiología Molecular e Inmunología de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS).

## 7.4 Diseño experimental

### 7.4.1 Esquema general del flujo de trabajo

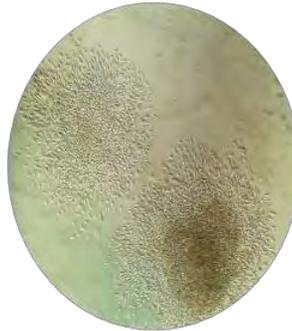


7.4.2 Esquema de la preparación de los medios condicionados y las líneas celulares a evaluar.

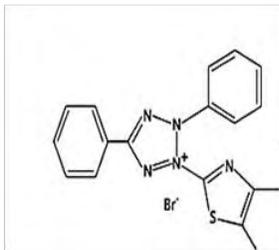


7.4.3 Esquema para el análisis de proliferación y citotoxicidad con sales de tetrazolio.

Fila	Contenido
A	MHV
B	MHV NPs Ag 125 µg/ml
C	DMEM



200 µl de medio  
condicionado



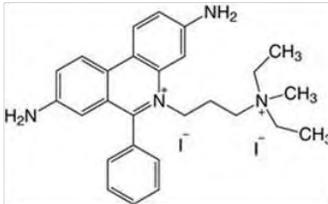
**MTT**

**LDH**

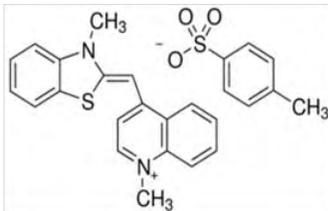


**Espectrofotómetro**

#### 7.4.4 Esquema para el análisis de la viabilidad celular mediante fluorescencia



**Ioduro de propidio**



**Naranja de tiazol**



**1 ml de medio  
condicionado**



**Tinción celular**

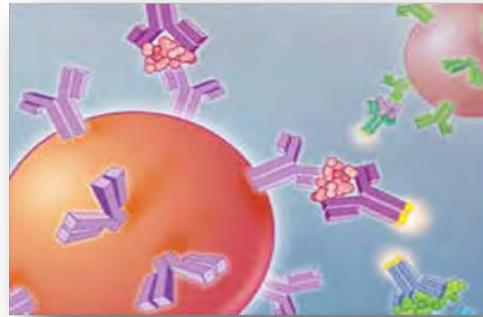


**Microscopio confocal**

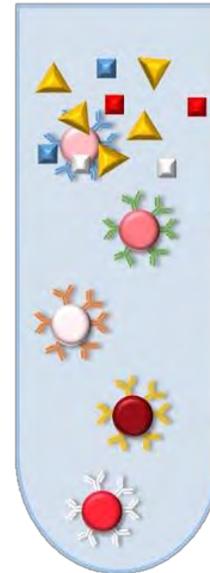
7.4.5 Esquema para el análisis de cuantificación de citocinas



50  $\mu$ l de medio de cultivo



50  $\mu$ l de Mezcla de perlas



50  $\mu$ l de Mezcla de perlas

Citocinas
IL-12
TNF $\alpha$
INF- $\gamma$
MCP1
IL-10
IL-6



Accury C6

#### 7.4.6 Cultivos 3D con MSCs sobre los hidrogel de MEC

**Hidrogel  
1 ml**

**Gelificación  
37 °C**

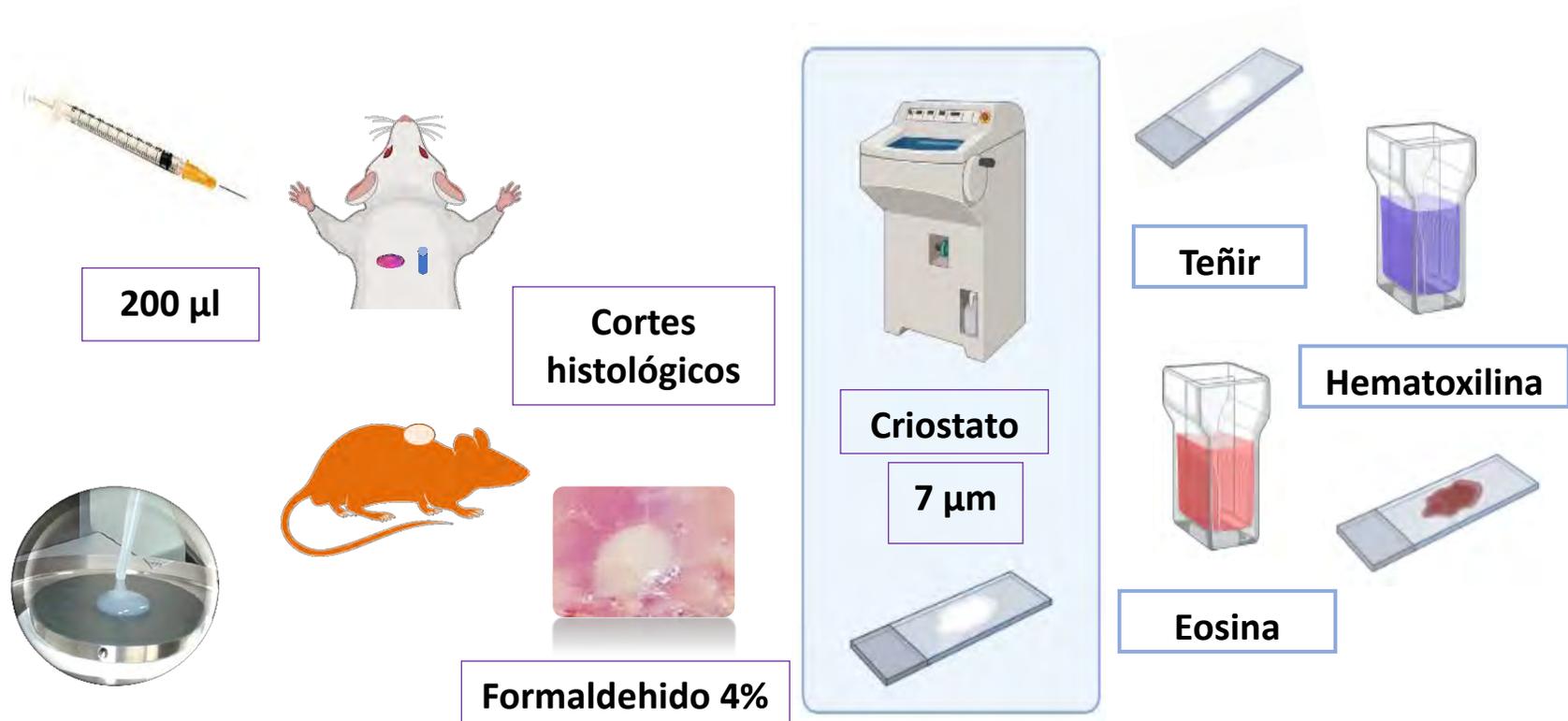
**DMEM  
1 ml**

**MSCs  
25.000**

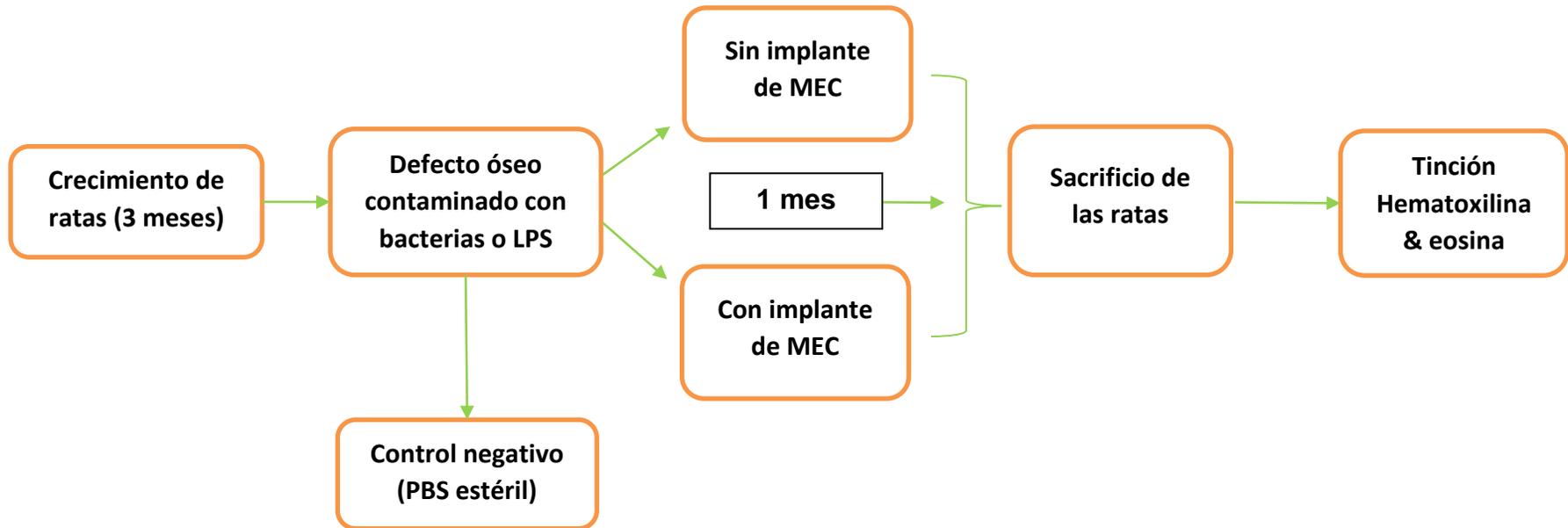


**37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> X 7**

### 7.4.7 Biocompatibilidad *in vivo*



#### 7.4.8 Esquema del modelo regenerativo *in vivo*



### 7.4.9 Esquema para el análisis antibacteriano

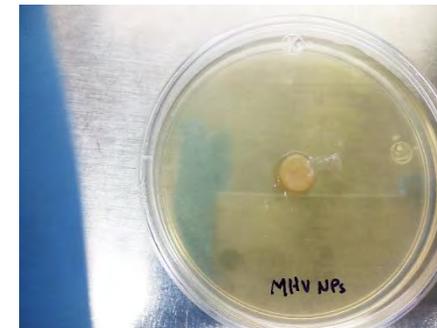
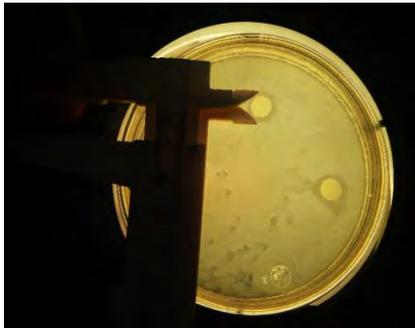
Fila	Contenido
A	MHV-NPs Ag 500 µg/ml
B	MHV-NPs Ag 500 µg/ml
C	MHV-NPs Ag 250 µg/ml
D	MHV-NPs Ag 250 µg/ml
E	MHV-NPs Ag 125 µg/ml
F	MHV-NPs Ag 125 µg/ml
G	Clorhexidina al 2%
H	MHV

**Diluciones seriadas**  
 (Tomar 100 µl columna 1 y homogenizarlos en la columna 2 y repetir el paso anterior hasta la columna 11).

**200 µl de hidrogeles columna 1**

**100 µl medio cultivo columna 2-12**

**100 µl de bacterias columna 1-11**



## **VIII. METODOLOGÍA**

### **8.1 Preparación y caracterización de las NPs Ag**

Se disolvieron 0.169 g de AgNO<sub>3</sub> en 100 ml de agua desionizada, esta solución se mezcló con 0.1 g de ácido gálico previamente disuelto en 10 ml de agua desionizada. Inmediatamente después, el pH se ajustó a 11 usando una solución de 0.1 M NaOH (Espinosa-Cristóbal et al., 2009).

El tamaño de las NPs Ag obtenido se caracterizó por dispersión de luz dinámica (DLS) con una longitud de onda de 633 nm, y un ángulo de detección de 90°; todas las muestras se analizaron durante 60 segundos a 25°C. Para confirmar su forma, las NPs Ag fueron analizadas por microscopio electrónico de transmisión (JOEL JEM-1230) con una aceleración de voltaje de 100kV.

### **8.2 Preparación de la vejiga porcina**

Las vejigas se cortaron en la base de la uretra para extracción de líquidos y lavado interno. Luego se desinfectaron sumergiendo el tejido en una solución de PBS con antibiótico-antimicótico. Enseguida se procedió a la delaminación mecánica de tejido para remover la capa más superficial de epitelio interno de la vejiga usando pinzas hemostáticas, mango para bisturí, hoja nº 15, pinzas y tijeras dentales quirúrgicas. Por último, se lavaron con agua destilada estéril colocándolas en un agitador orbital a 200 rpm en refrigeración durante 48 horas con recambio del agua a las 24 horas.

### **8.3 Proceso de descelularización por inmersión**

Después de las 48 horas de lavado, se retiró el agua y se sumergieron en tripsina-EDTA al 0.25% por 1 hora a 37°C en agitación a 200rpm. Enseguida se retiró la solución químico-enzimática decantando el contenido y exprimiendo los tejidos contra el fondo del vaso de precipitado. Para inactivar la acción enzimática se empleó una solución de PBS 1x suplementada con 10% de suero fetal bovino (SFB) incubando durante 10 horas. Por último, se deshidrató el tejido mediante liofilización durante 24 horas y se pulverizó en un molino eléctrico.

### **8.4 Digestión, gelificación y funcionalización**

Se digirieron 200 mg de MEC con 40 mg de pepsina en 10 ml de HCl bajo agitación constante durante 48 horas a temperatura ambiente. Luego, se agregó 1 ml de PBS 10X y se ajustó el pH a 7.2 con hidróxido de sodio. En este punto, se cargaron con las NPs Ag y se homogenizaron por 30 segundos en vórtex. Para la gelificación de los pregeles se incubaron a 37 °C durante 1 hora (Sawkins et al., 2013).

### **8.5 Determinación de presencia de colágeno del hidrogel a través de SDS-PAGE**

Se utilizó un gel separador al 7 % y un gel concentrador al 10 %. Se le aplicó un pretratamiento a la muestra dejando incubar en baño maría a 90-100°C por 5 minutos y se corrió con una carga de 100 v hasta salir del gel concentrador y 80 v

hasta que el buffer salga del gel. La visualización de las proteínas se obtuvo tiñendo con azul de Coomassie R-250.

## **8.6 Cuantificación de colágeno de los pregeles de MEC de vejiga porcina**

Para la cuantificación del contenido de colágeno presente en la MEC se empleó una técnica de evaluación espectrofotométrica basada en la absorbancia derivada de la formación de un cromóforo a partir de la oxidación de la hidroxiprolina. Para ello se colocó 1 ml de pregel de MEC en tubos de ensayos con rosca, a éstos se le añadieron 3 ml de HCl 6 M y luego se colocaron en la autoclave por 3 horas a 125 °C para hidrolizar el contenido de proteínas. El material hidrolizado se dejó secar a baño María a 100 °C durante  $\approx$  6 horas, luego éste se resuspendió con 200  $\mu$ l de la solución de cloramina T al 0.56% y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 1 ml de reactivo de Erlich se agregó, se homogenizó e incubó a 50°C durante 90 minutos. Por último, se registraron las absorbancias en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm. Para determinar las concentraciones de colágeno de la MEC se realizó una curva estándar a partir de colágeno puro y éste se sometió al mismo procedimiento que se efectuó para la MEC.

## 8.7 Preparación de medios condicionados

Para la evaluación de la biocompatibilidad celular *“in vitro”* se prepararon medios condicionados de los hidrogeles de MEC y de los hidrogeles de MEC con NPs Ag. Primero en un microtubo de 1.5 ml se colocaron perlas de vidrio de 0.05 mm hasta la marca de los 2 ml. Luego se colocó 1 ml de hidrogel a una concentración de 20 mg /ml más 9 ml de medio de cultivo suplementado (10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina). Los microtubos se llevaron al disruptor de tejidos durante 1 minuto a máxima velocidad y se incubaron a 37 °C en agitación constante durante 24 horas. Por último, los medios de cultivo se centrifugaron a 13,000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes con una jeringa estéril para ser filtrados en una unidad de filtración con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

## 8.8 Cultivo celular

Se sembraron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AD-MSCs) y fibroblastos NIH/3T3 (Fb) en frascos de 75  $\text{cm}^2$  con medio de cultivo DMEM-F12 suplementado y los macrófagos Raw/264.7 (M $\phi$ ) con medio de cultivo DMEM suplementado. Para la expansión celular las cajas de cultivo se incubaron a 37 °C en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad hasta que el cultivo alcanzó una confluencia de 70%. En este punto, las células se desprendieron de la caja de cultivo empleando un método químico-enzimático con tripsina-EDTA (0.25%) para la realización de las distintas evaluaciones *“in vitro”* (Karamzadeh,

Eslaminejad, & Aflatoonian, 2012). Se determinó la viabilidad y concentración celular a través de una tinción de exclusión de vitalidad con azul de tripano (0.4%) y con la cámara de Neubauer, respectivamente.

## **8.9 Ensayos de citotoxicidad y proliferación celular**

Para los ensayos de proliferación celular y citotoxicidad celular, se emplearon cajas de cultivo de 96 pozos. Se sembraron 7,500 células/pozo para el ensayo del MTT y 15,000 células/pozo para en ensayo del LDH de cada una de las 3 líneas celulares. Previo a los ensayos se permitió la adherencia y establecimiento celular durante 24 h con medio estándar. Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se colocaron 200 µl de los medios condicionados o medio DMEM como control. Tras la exposición a los extractos de los materiales, se llevaron a cabo los procedimientos para la evaluación.

Se empleó un método espectrofotométrico basado en la absorbancia derivada de la formación de un cromóforo a partir de la degradación enzimática de sales de tetrazolio con un lector de placas. Se empleó una longitud de onda de 570 nm para el Kit CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) y 490 nm para el Kit CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Cytotoxicity Assay (LDH) ambos de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los ensayos de proliferación los tiempos de evaluación fueron de 24, 48 y 72 h, mientras que para los ensayos de citotoxicidad se evaluó a las 24 h de exposición a los extractos.

### **8.10 Ensayos de viabilidad celular mediante fluorescencia**

Se evaluó el estado de vitalidad celular a través de fluorocromos de vida y muerte. En cajas de 24 pozos se colocaron cubreobjetos, previamente desinfectados y esterilizados. Se cultivaron 100,000 células/pozo, de cada una de las 3 líneas celulares, con medio de cultivo estándar permitiendo la adherencia y establecimiento celular durante 24 h. Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se colocó 1 ml de los medios condicionados o medio DMEM como control. Tras 24 h de exposición a los extractos se evaluó la viabilidad celular empleando naranja de tiazol como indicador de vitalidad emitiendo fluorescencia en verde o yoduro de propidio como indicador de muerte celular emitiendo fluorescencia en rojo.

### **8.11 Ensayos de análisis de expresión de citocinas**

Se estimuló la producción de citocinas con los extractos de los materiales con la línea celular de Mø para la identificación y cuantificación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias de los sobrenadantes del cultivo. En cajas de 6 pozos se colocaron 500,000 células/pozo con medio de cultivo estándar permitiendo la adherencia y establecimiento celular durante 24 h. Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se colocaron 2 ml de los medios condicionados o medio DMEM como control. Tras 24 horas de exposición a los estímulos se evaluó la producción de citocinas mediante el método de matrices de perlas citométricas (CBAs).

Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD Immunocytometry Systems) analizando un total de 2,100 eventos por muestra. Se empleó un umbral de detección en FSC-H de 500,000 para eliminar la aparición de detritos celulares y los filtros FL2 y FL3 para la detección de las fluorescencias de las CBAs por medio de gráficos density plot. El análisis de las intensidades media de fluorescencia se evaluaron en el software FCAP Arrays para la cuantificación en Pg/ml.

### **8.12 Ensayos de cultivos 3D con MSCs sobre los hidrogeles de MEC**

Primero se preparó la caja de cultivo de 24 pozos colocando 1 ml del hidrogel de MEC de vejiga y se gelificaron a 37 °C durante 1 hora. Se cultivaron 25,000 MSCs sobre el hidrogel, se les suministró 1 ml de medio de cultivo suplementado y se incubaron a 37 °C durante 7 y 14 días. La penetración de las células en los hidrogeles se evaluó mediante cortes histológicos de la MEC. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se fijó la muestra con 1 ml de PBS 1x con formalina y se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

Para la realización de los cortes histológicos, el hidrogel se extrajo del pozo de cultivo con un sacabocado y el fragmento de hidrogel se cortó a la mitad con un cubreobjetos. Éstos se colocaron en forma vertical en un molde de aluminio con polifreeze y se congelaron colocando el molde con la muestra en nitrógeno líquido. Los cortes se realizaron en un crióstato con un grosor de 20 µm, éstos se transfirieron a una laminilla con L-polilisina para facilitar la adherencia y se fijaron

sumergiendo la muestra en acetona a -20 °C durante 15 minutos. Por último, las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina y se observaron al microscopio para confirmar la colonización del hidrogel.

### **8.13 Ensayos de biocompatibilidad *in vivo***

Para evaluar la biocompatibilidad de los hidrogeles de MEC de vejiga de cerdo se emplearon ratas Wistar de 3 meses de edad. Los animales se anestesiaron con cloroformo y se inocularon con una jeringa de 10 unidades 100 µl de hidrogel en el dorso del animal de manera subdérmica tomando como referencia la línea media. 30 minutos antes del sacrificio se inyectarán 200 µl/kg de azul de Evans en la vena de la cola y 1 hora después de la inyección del colorante se empezó a observar la coloración del tejido. El tejido se fijó con PBS 1x con paraformaldehído 4 %. Posteriormente un fragmento de 1 cm de diámetro alrededor de la extravasación se recuperó y se realizaron las evaluaciones histológicas para definir el tipo e intensidad de la reacción inflamatoria.

### **8.14 Ensayos de actividad antibacteriana de concentración mínima inhibitoria**

Las bacterias, se adquirieron en la ATTC (American Type Culture Collection) y fueron cultivadas según sus necesidades. Se tomó una concentración de  $2.3 \times 10^7$  UFC/ml y se extendieron sobre placas de cultivo con TSA. Luego se tomó una colonia para sembrar en medio de cultivo líquido TSB. Para evaluar la actividad

antibacteriana de los hidrogeles se empleó un ensayo para conocer la concentración mínima inhibitoria del material. Para ello se colocaron diversas concentraciones del material en cajas de cultivo de 96 pozos y se realizaron las microdiluciones en medio de TSB para por último colocar una concentración de  $2.3 \times 10^5$  de bacterias. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C y se evaluó la turbidez del medio de cultivo.

### **8.15 Modelo experimental regenerativo *in vivo***

Se utilizaron ratas Wistar de 3 meses con un rango de peso de 250-300 g, alimentadas con dieta normal estéril (LabDiet 5010, USA) y agua *ad libitum* con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. A estas ratas se les efectuó un daño mecánico en el hueso del maxilar en la región de los incisivos inferiores. Para ello, se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital (63 mg/Kg) y se procedió a realizar el desprendimiento del tejido gingival con la ayuda de un bisturí No. 15. Luego con un dremel y una fresa a 150 rpm se eliminó el hueso. Sobre éste se depositaron 4 µl de LPS de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* a una concentración de 5 µg/µl o 4 µl de *E. faecalis* a una concentración de  $1.6 \times 10^9$  c/ml como control negativo se aplicaron 4 µl solución salina estéril. En este punto, se rellenó la zona con hidrogel y se reposicionó el tejido gingival pegando con metacrilato (Dumitrescu, Abd-El-Aleem, Morales-Aza, & Donaldson, 2004). A los 30 días se sacrificaron las ratas para evaluar el proceso de regeneración mediante un análisis histológico.

## 8.16 Análisis estadístico

Los resultados de las variables cuantitativas se representaron como promedio  $\pm$  su desviación estándar (DS). Los datos cualitativos se expresaron como porcentajes  $\pm$  su DS. Para todos los análisis se utilizó el programa IBM SPSS v20.0 (SPSS inc, IL, USA), los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianzas (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95%.

## 8.17 Cuidado y manejo de los animales

El manejo cotidiano y durante los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud-2014 y a las normas de salud NOM-062-ZOO-1999, las cuales buscan:

- Evitar al máximo el sufrimiento de los animales
- Usar un procedimiento que garantice una muerte sin sufrimiento al momento de sacrificar un animal
- Proporcionar un máximo de comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen la situación
- Proteger al personal de laboratorio involucrado en el cuidado de animales

Para ello se identificó en las ratas de laboratorio signos de enfermedad, conducta anormal, dolor y sufrimiento. Se les proporcionó alimento estéril y agua potable *ad libitum*, condiciones de temperatura y ventilación adecuadas, también fueron

sexados y agrupados de acuerdo a las condiciones y necesidades que se requerían.

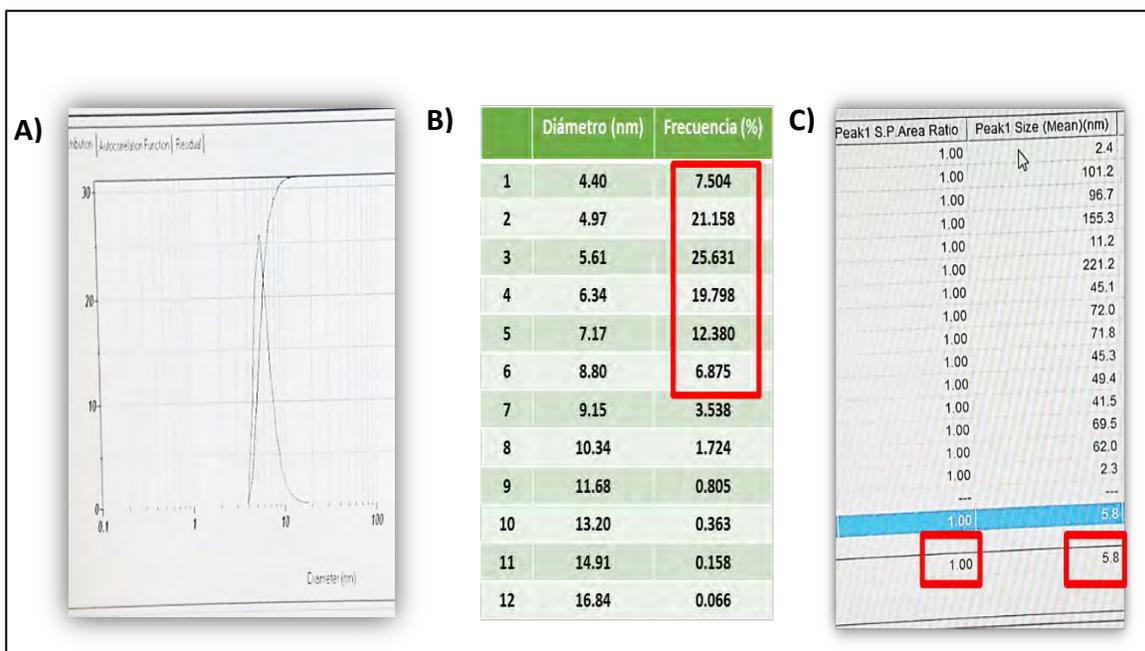
Las jaulas donde fueron alojadas contaron con diversos registros para un adecuado control y se acondicionaron con aserrín para favorecer su aislamiento térmico y construcción de nido, garantizar la absorción de su orina, excremento, desperdicio de agua y facilitar la limpieza.

Además, la limpieza de las jaulas se realizó de manera periódicamente y los desechos, el manejo de cadáveres y residuos patológicos se llevó a cabo acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 para los Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos.

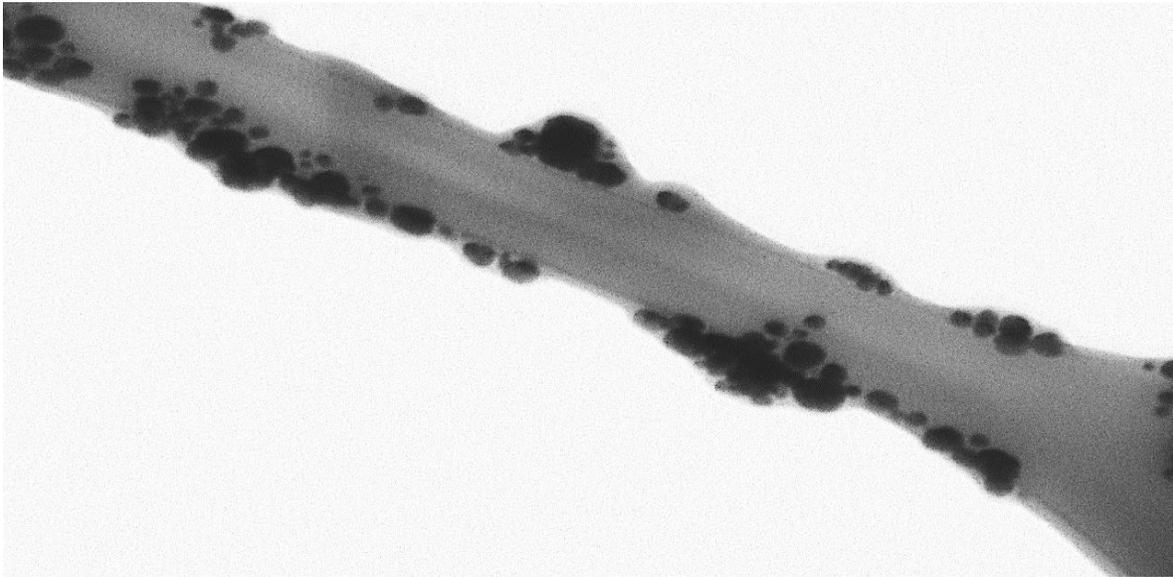
## IX. RESULTADOS

### 9.1 Síntesis de nanopartículas de plata

A partir de soluciones de nitrato de plata y ácido gálico se sintetizaron NPs Ag con un tamaño promedio de 5.8 nm. Los resultados del DLS muestran que se obtuvo un solo pico en emisión correspondiente a un rango de tamaños de las NPs Ag entre los 4.6 nm hasta los 15.7 nm (Fig. 1). Así mismo se logró determinar la forma de las NPs Ag mediante microscopía electrónica de transmisión presentando estas una forma esférica y cuasiesférica (Fig. 2).



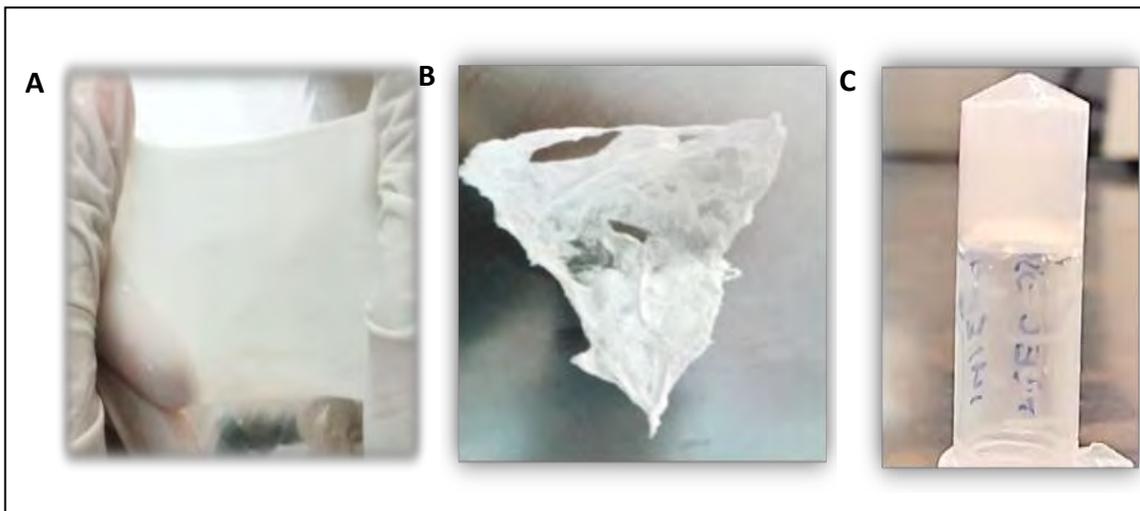
**Figura 1. Determinación del tamaño de las NPs Ag en el DLS.** A. Registro de un solo pico de dispersión en el histograma. B. Rango de tamaños de las NPs Ag. C. Promedio del tamaño de NPs Ag.



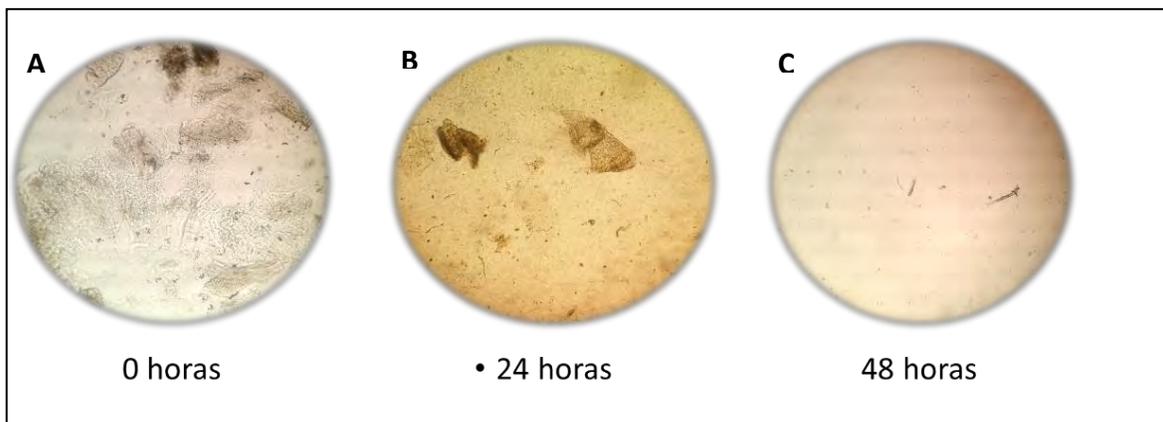
**Figura 2. Determinación de la forma de las NPs Ag a través de microscopio electrónico de transmisión.**

## **9.2 Obtención de un hidrogel de MEC de vejiga de cerdo descelularizada**

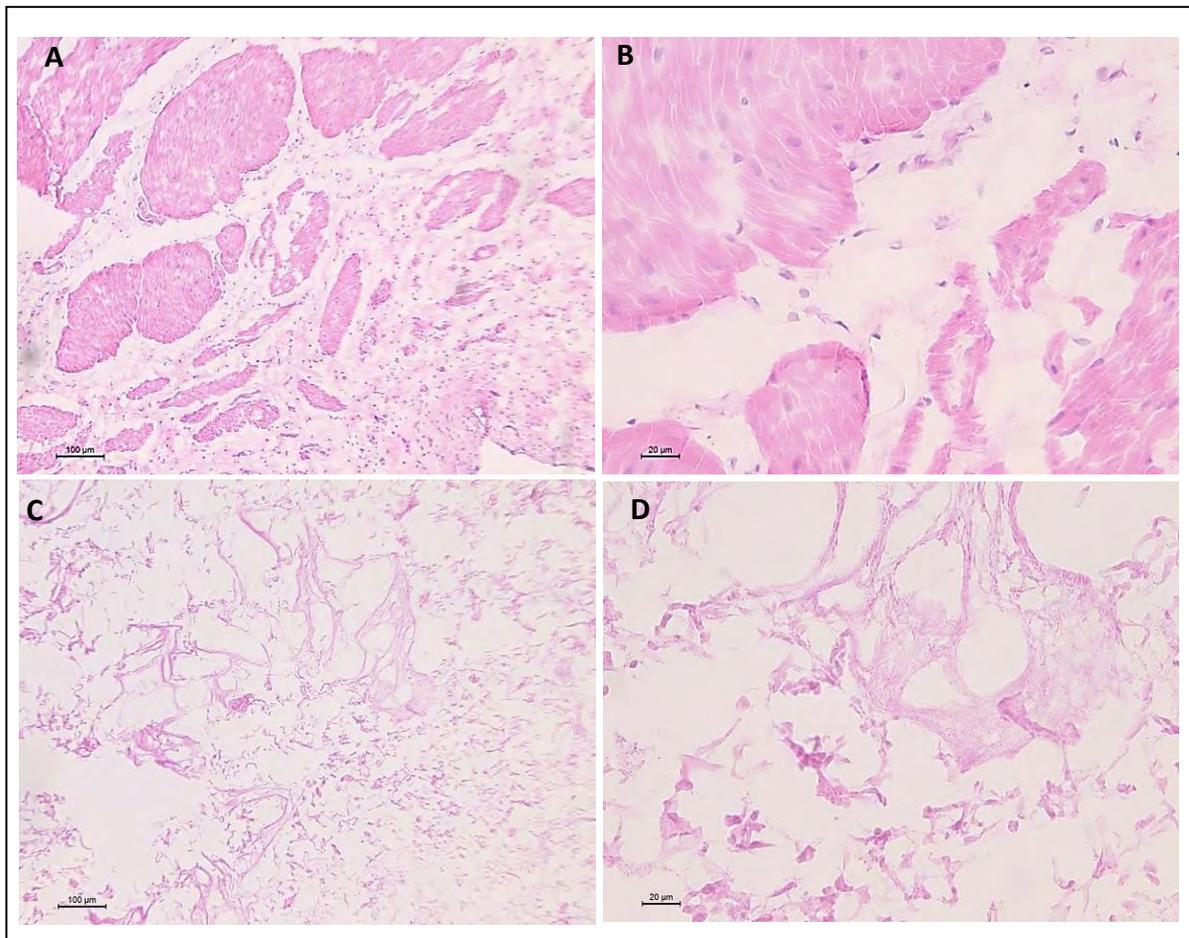
A partir de la vejiga de cerdo se logró obtener MEC en formulación de hidrogel (Fig. 3). Durante la digestión enzimática de los componentes de la MEC se monitoreó la degradación de fibras proteicas a las 0, 24 y 48 h para la obtención del hidrogel (Fig. 4). En esta investigación se empleó un método de descelularización sin detergentes logrando obtener una MEC sin la presencia de células o núcleos celulares (Fig. 5), demostrando que se realizó un buen proceso de remoción de células del tejido.



**Figura 3. Fases de la formación del hidrogel de la MEC de vejiga de cerdo.** A. Membrana de MEC descelularizada. B. Hoja liofilizada de MEC. C. Hidrogel de MEC.



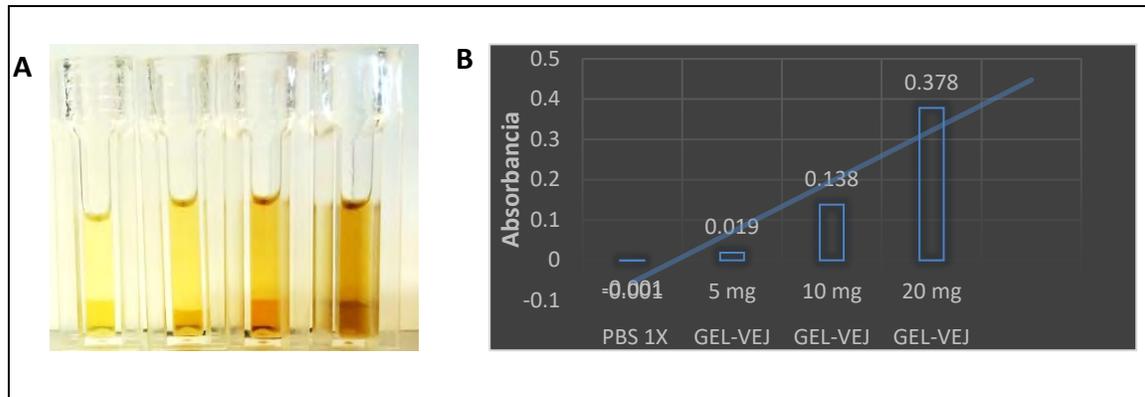
**Figura 4. Digestión con pepsina de la MEC liofilizada.** Evaluación microscópica de la presencia de fibras proteicas con un objetivo de 4X. A. Presencia de una gran cantidad de fibras. B. Disminución de las fibras fue mínima. C. MEC sin presencia de fibras.



**Figura 5. Evaluación histológica del proceso de descelularización.** Cortes histológicos teñidos con hematoxilina & eosina antes (A-B) y después (C-D) del tratamiento de remoción del contenido celular. A y C. microfotografía tomada con un objetivo de 10X. B y D. Microfotografía tomada con un objetivo de 40X.

### 9.3 Concentraciones de colágena en la MEC de vejiga de cerdo

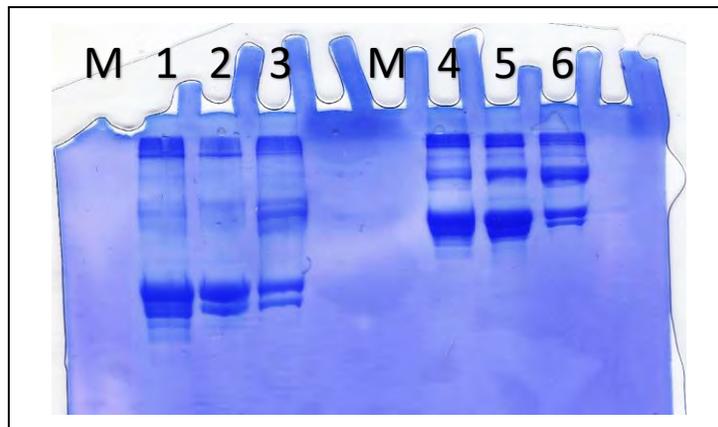
Al evaluar el contenido de colágeno en la MEC mediante diluciones seriadas (proporción 1:1) se logró obtener 3 concentraciones: 20 mg/ml para la concentración mayor, 10 mg/ml para la primera dilución y 5 mg/ml. Se registraron las absorbancias de muestras obteniendo valores de 0.019 en la concentración de 5 mg/ml hasta valores de 0.378 para la concentración de 20 mg/ml (Fig. 6).



**Figura 6. Cuantificación de las concentraciones de hidroxiprolina de la MEC.** A. El cambio en la intensidad del color en cada una de las muestras de MEC de vejiga de cerdo debido al cromógeno producido por la interacción del reactivo de Erlich con la hidroxiprolina oxidada. B. Registro de las absorbancias obtenidas al leerse en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm.

#### 9.4 La MEC de vejiga de cerdo contiene principalmente proteínas de colágeno tipo I

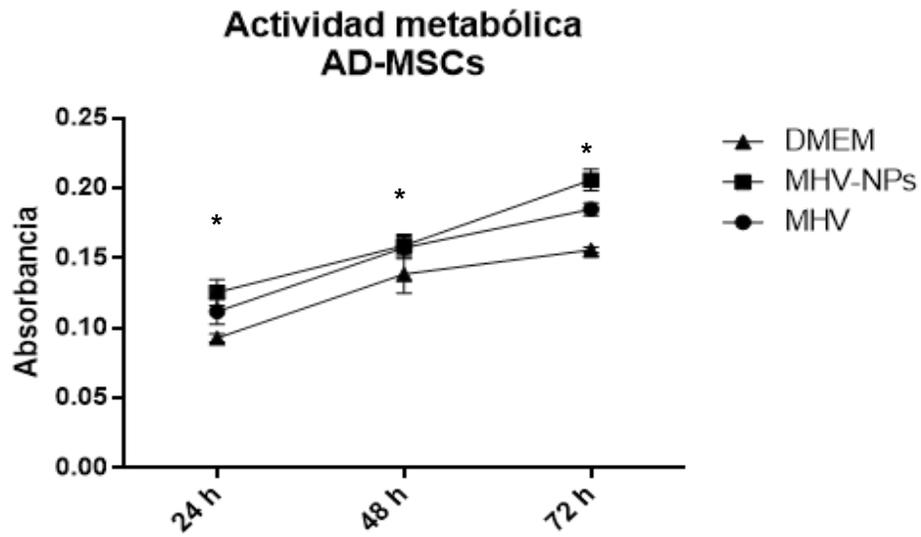
Tomando como referencia el colágeno tipo I de cola de rata purificado se comparó el perfil proteico de la MEC obtenida. A través SDS-PAGE este se distingue con un patrón electroforético de bandeo característico de 2 subunidades mayores y una subunidad pequeña. En los carriles donde se colocaron los hidrogel de MEC se presentó el mismo patrón de bandeo correspondiente al colágeno tipo I (Fig. 7).



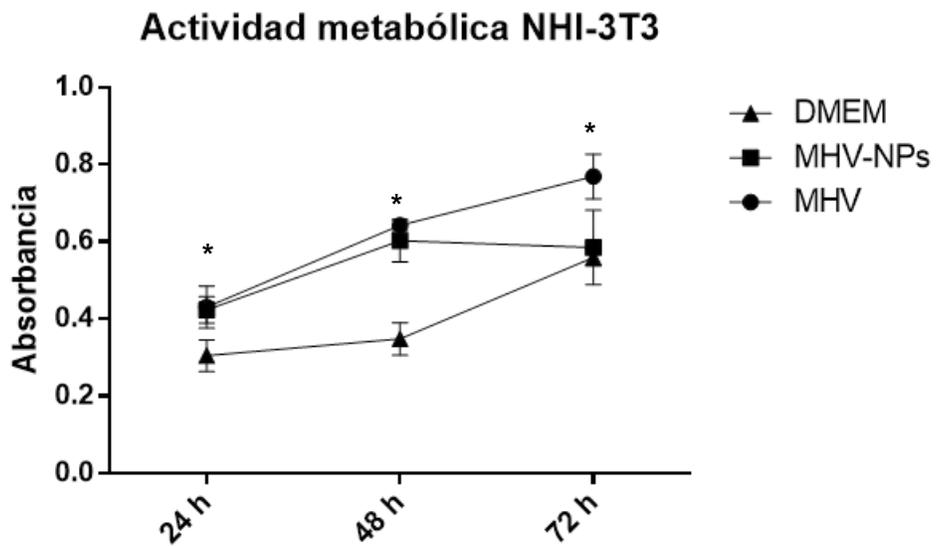
**Figura 7. Identificación de colágeno de la MEC de acuerdo a su movilidad electroforética.** M: Marcador de peso molecular. 1, 2, 4 y 5: Hidrogel de vejiga. 3 y 6: Col tipo I.

### 9.5 Biocompatibilidad celular con extractos de MEC

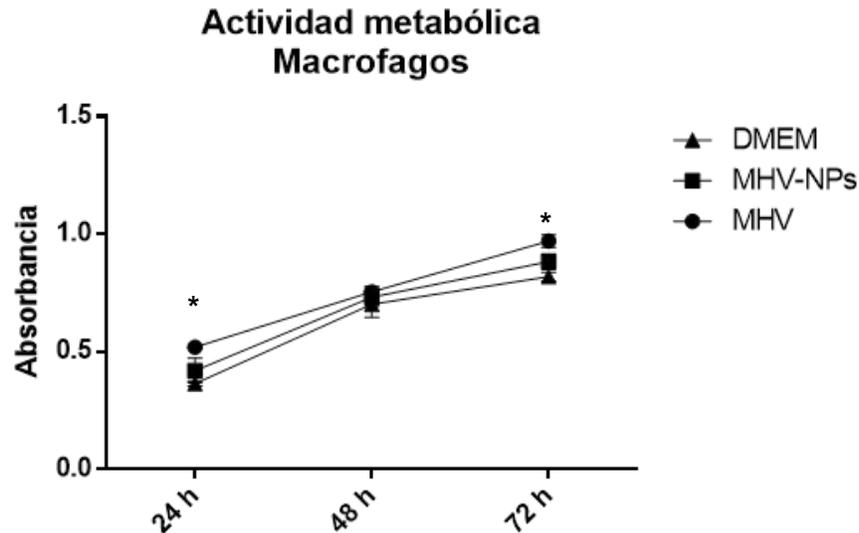
En las 3 líneas celulares expuestas a los extractos de MEC de los hidrogeles (MHV) se registraron mayores tasas de actividad metabólica en comparación con el grupo control en cada uno de los tiempos de evaluación, siendo estas diferencias estadísticas significativas. Así mismo, estos resultados fueron replicados por el grupo experimental MHV NPs Ag con la línea celular AD-MSCs. La misma tendencia se observó para la línea celular NIH-3T3, excepto a las 72 h donde la actividad metabólica disminuye a un nivel comparable al grupo control. Por su parte, los Mø expuestos a los hidrogeles con NPs Ag no presentaron un incremento contundente en comparación con el grupo control (Figura 8-10).



**Figura 8.** Registro de las absorbancias de los ensayos de MTT con AD-MSCs.  
\*P<0.05.



**Figura 9.** Registro de las absorbancias de los ensayos de MTT con NHI-3T3.  
\*P<0.05.



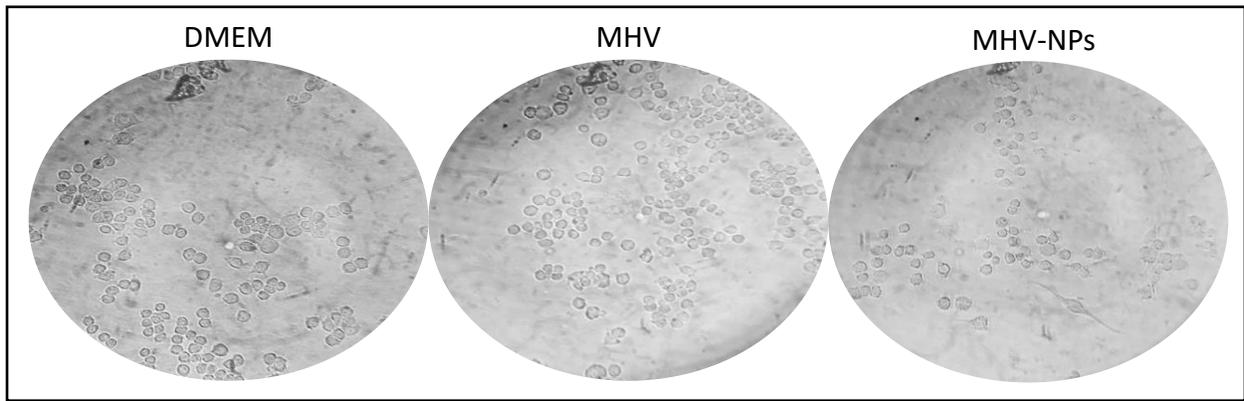
**Figura 10. Registro de las absorbancias de los ensayos de MTT con Mø Raw 264.7. \*P<0.05.**

Los ensayos de biocompatibilidad mostraron que los extractos de MEC con o sin NPs Ag no afectan funciones básicas para la sobrevivencia como lo son la adherencia, migración y proliferación celular. En las microfotografías tomadas en campo claro se observan las células de las 3 líneas celulares adheridas a la placa de cultivo y con una morfología celular típica durante los tiempos de evaluación (Fig.11-19). Así mismo, se observa una de las posibles causas del incremento en la actividad metabólica de las células de los grupos experimentales. En el grupo DMEM se desarrollaron unidades formadoras de colonia permitiendo la interacción célula-célula y el establecimiento de colonias, mientras que en los grupos experimentales las células tendieron a migrar, potencializando la fase exponencial del cultivo celular (Fig. 20-22). Así mismo, la confluencia celular en los grupos experimentales fue elevada comparado con el grupo control, mostrando que la

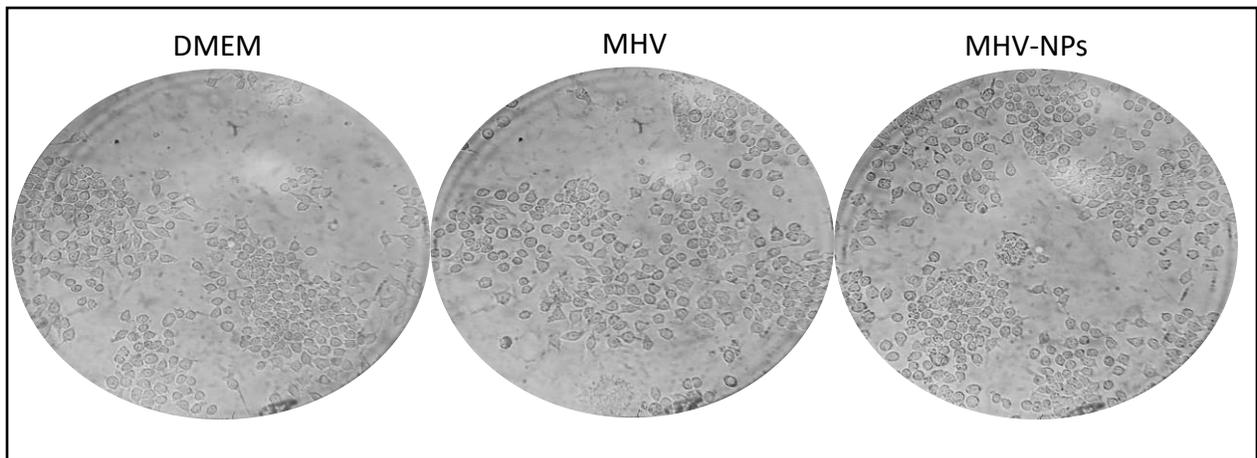
proliferación celular se ve alterada por los extractos de MEC, sugiriendo un cambio en el estado de activación celular. Además, la funcionalización del hidrogel con NPs Ag no modificó los resultados observados en el grupo experimental MHV.

Sin embargo, en los resultados de las pruebas de fluorescencia si se logró apreciar que las 3 líneas celulares del grupo experimental MHV-NPs presentaron cambios en la morfología celular o en la pérdida de la integridad de la membrana celular. Los fibroblastos NIH/3T3 y AD-MSCs a pesar de que no presentaron efectos sobre la integridad de membrana celular, observándose como células vitales, estas se observan delgadas, con un menor tamaño y se encontraban escasamente representadas en el área de cultivo en comparación con los grupos MHV y control. Además, los Mø lograron incorporar naranja de tiazol sugiriendo muerte o daño celular. En el grupo experimental MHV las 3 líneas celulares presentan un buen estado de viabilidad celular comparado con el grupo control, desplegando la morfología celular típica de cada uno de los linajes celulares (Fig. 23).

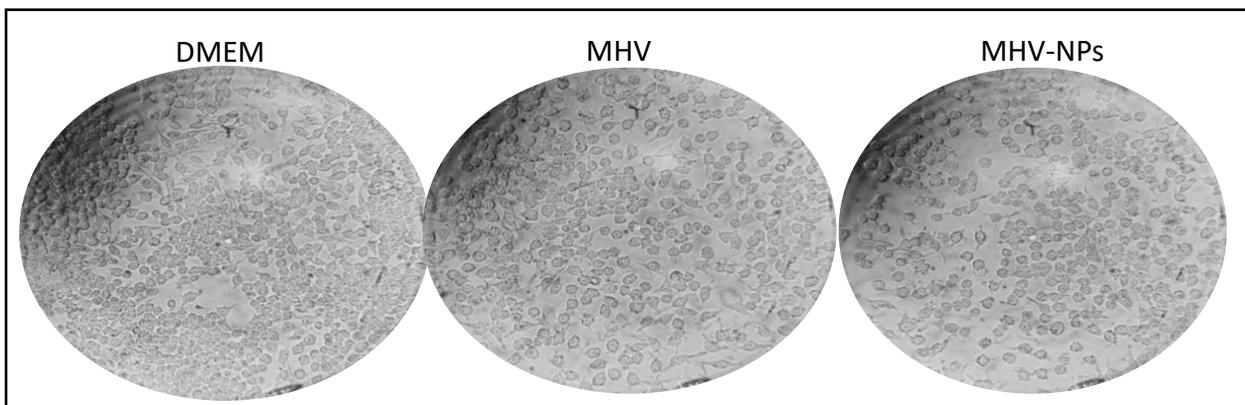
Sin embargo, las absorbancias registradas de los resultados de los ensayos de LDH indican que no existe lisis celular tras la exposición de los Mø a los extractos de MEC con NPs (Fig. 24). Aunque si se pudieron apreciar ligeros incrementos en la actividad de la enzima LDH en los resultados de las absorbancias con las líneas celulares NIH/3T3 y AD-MSCs (Fig. 25 y 26).



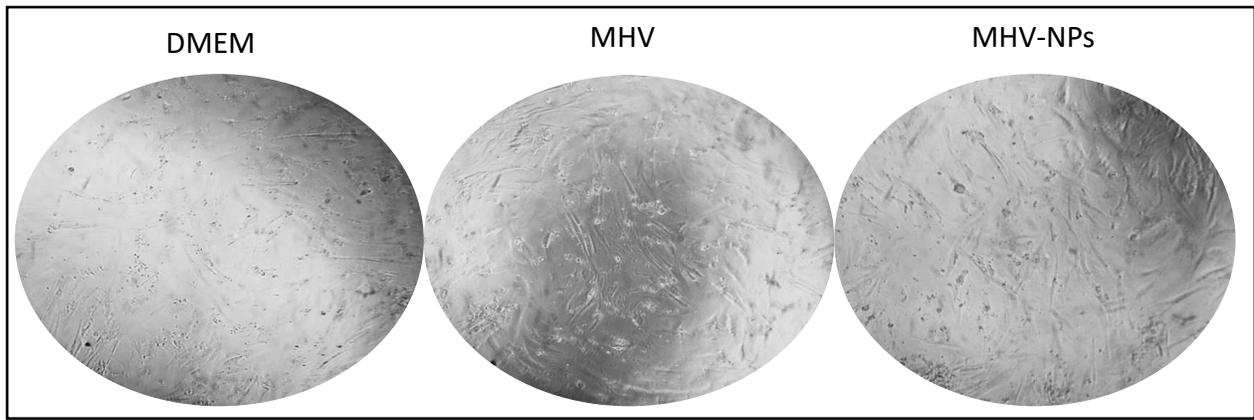
**Figura. 11. Mø Raw 264.7 expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 24 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 40X.**



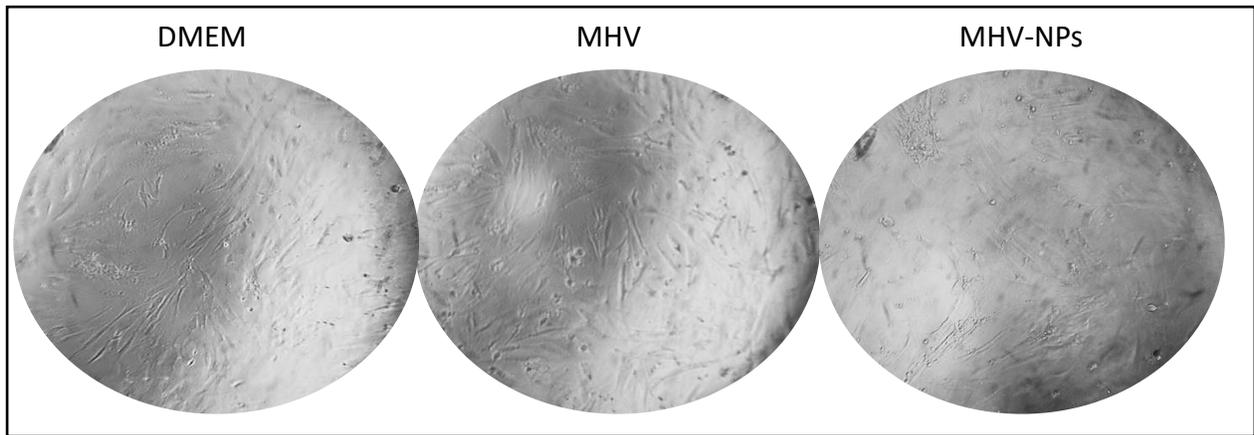
**Figura. 12. Mø Raw 264.7 expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 48 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 40X.**



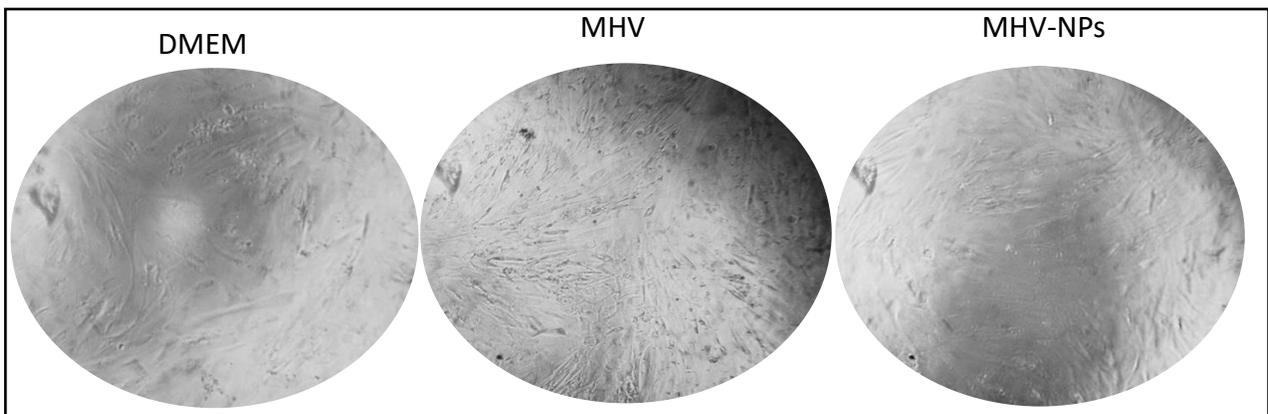
**Figura. 13. Mø Raw 264.7 expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 72 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 40X.**



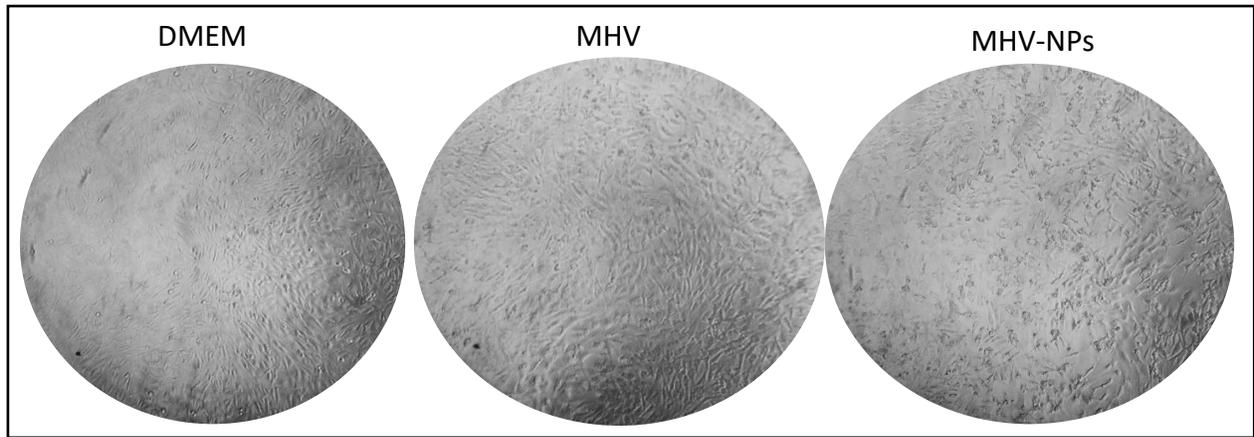
**Figura. 14. AD-MSCs expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 24 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 10X.**



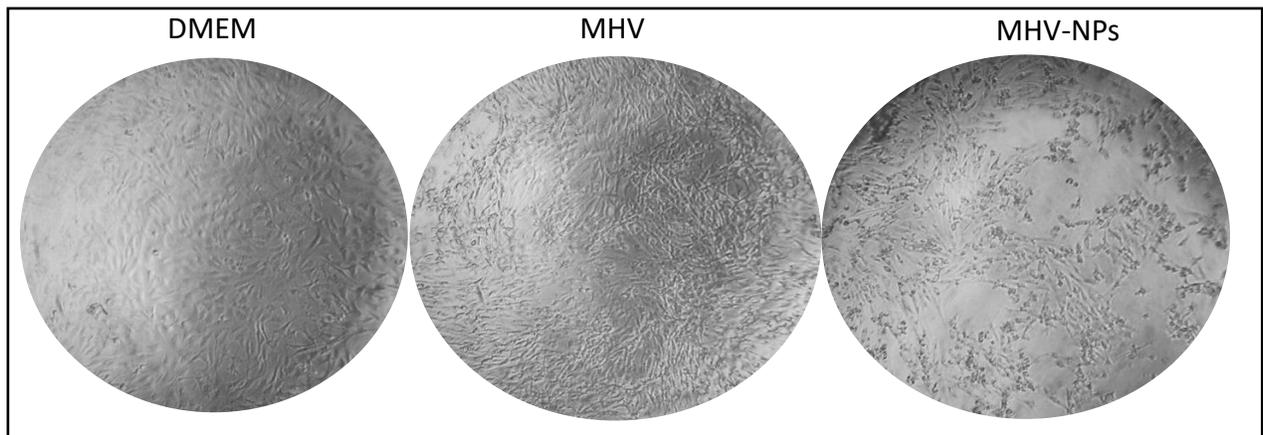
**Figura. 15. AD-MSCs expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 48 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 10X.**



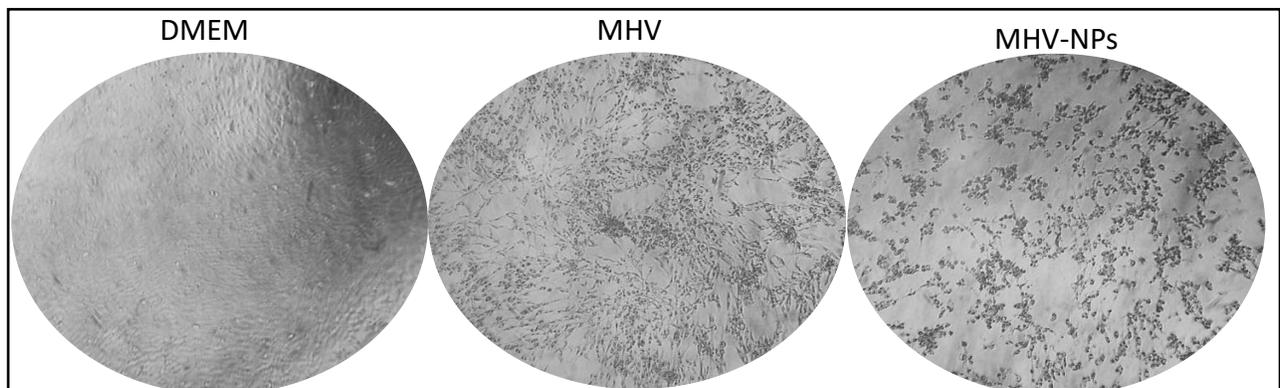
**Figura. 16. AD-MSCs expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 72 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 10X.**



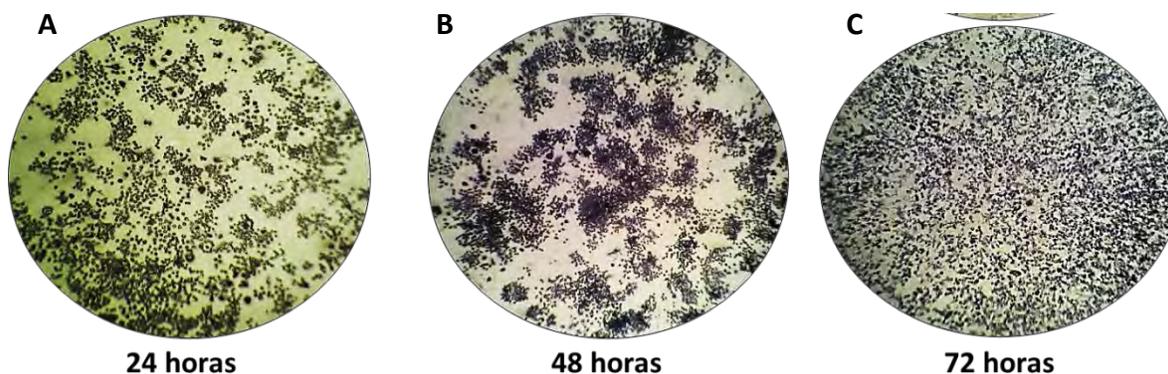
**Figura. 17. NIH/3T3 expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 24 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 10X.**



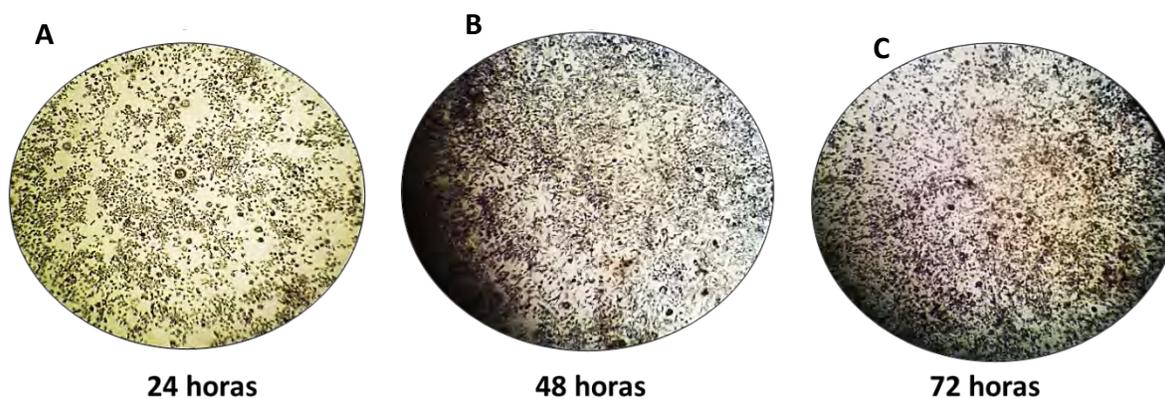
**Figura. 18. NIH/3T3 expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 48 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 10X.**



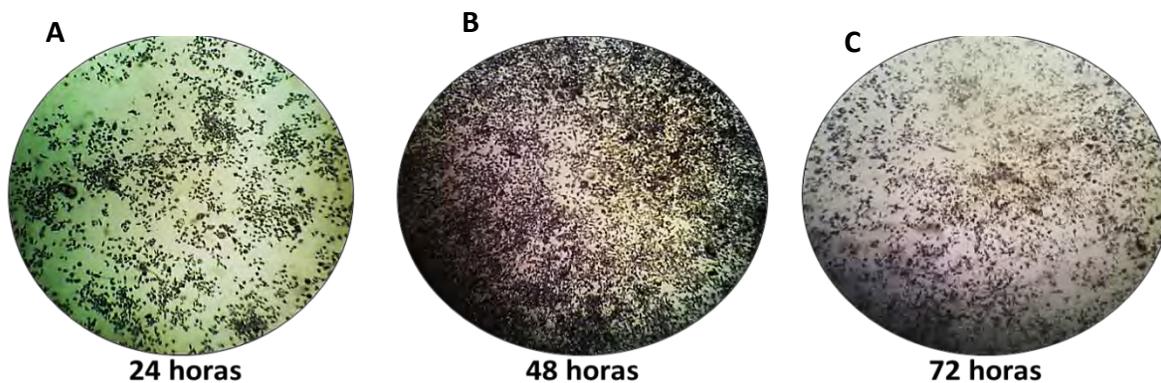
**Figura. 19. NIH/3T3 expuestos a extractos de MEC, MEC-NPs y grupo de control a las 72 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 10X.**



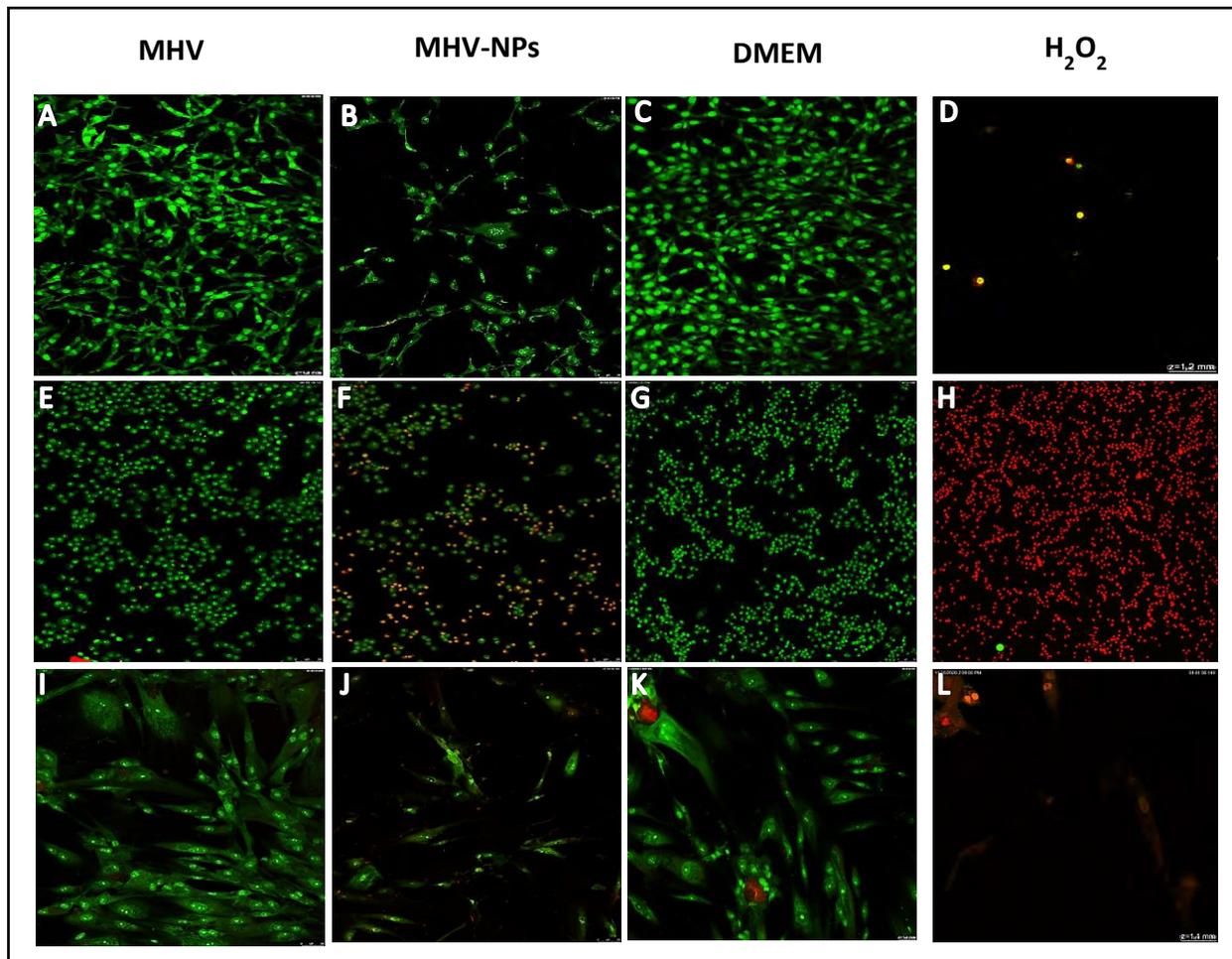
**Figura.20. Microfotografías de los ensayos de actividad metabólica con sales de MTT con Mø Raw 264.7 del grupo control.** A. Establecimiento del cultivo a las 24 h. B. Desarrollo de unidades formadoras de colonia a las 48 h y C. Fase de exponencial del cultivo.



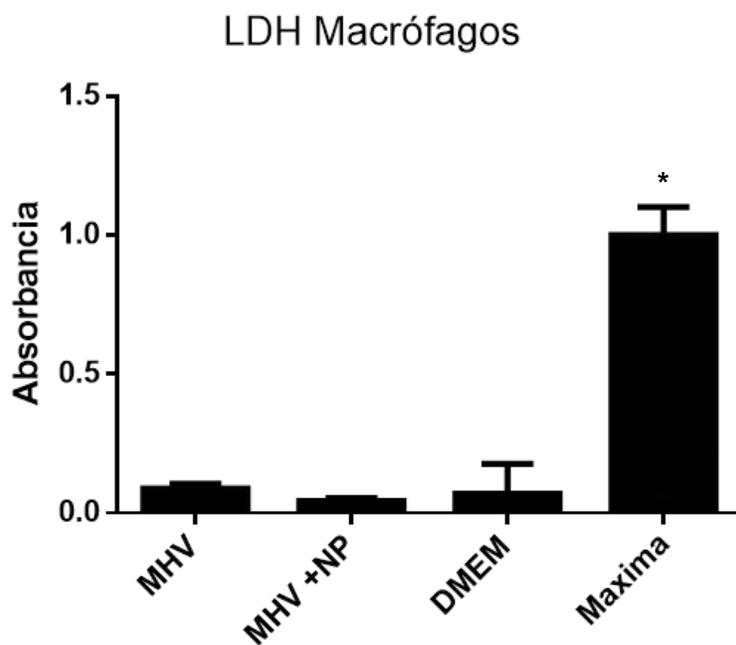
**Figura. 21. Microfotografías de los ensayos de actividad metabólica con sales de MTT con Mø Raw 264.7 del grupo MHV.** A. Establecimiento del cultivo a las 24 h. B. Inhibición del desarrollo de unidades formadoras de colonia a las 48 h. B y C. Fase de exponencial del cultivo.



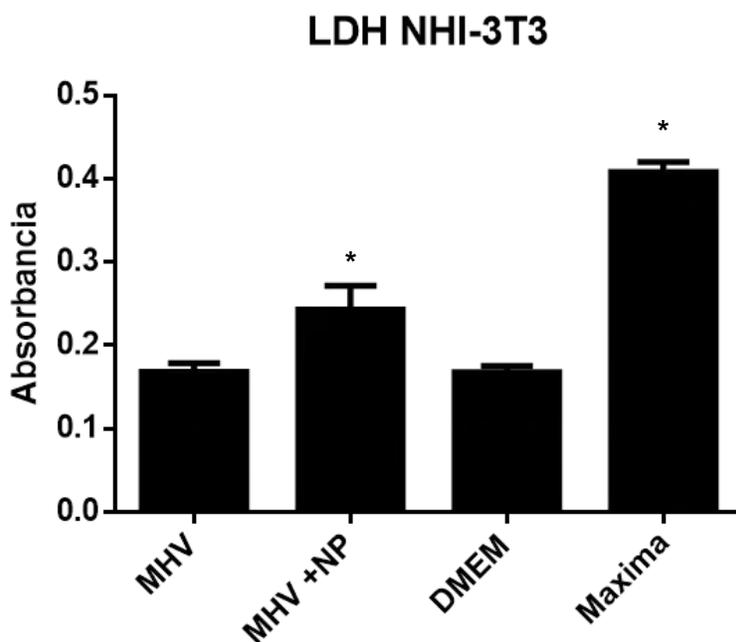
**Figura. 22. Microfotografías de los ensayos de actividad metabólica con sales de MTT con Mø Raw 264.7 del grupo MHV NPs Ag. A. Establecimiento del cultivo a las 24 h. B. Inhibición del desarrollo de unidades formadoras de colonia con fase de exponencial del cultivo a las 48 h. C. Cultivo en fase de senescencia.**



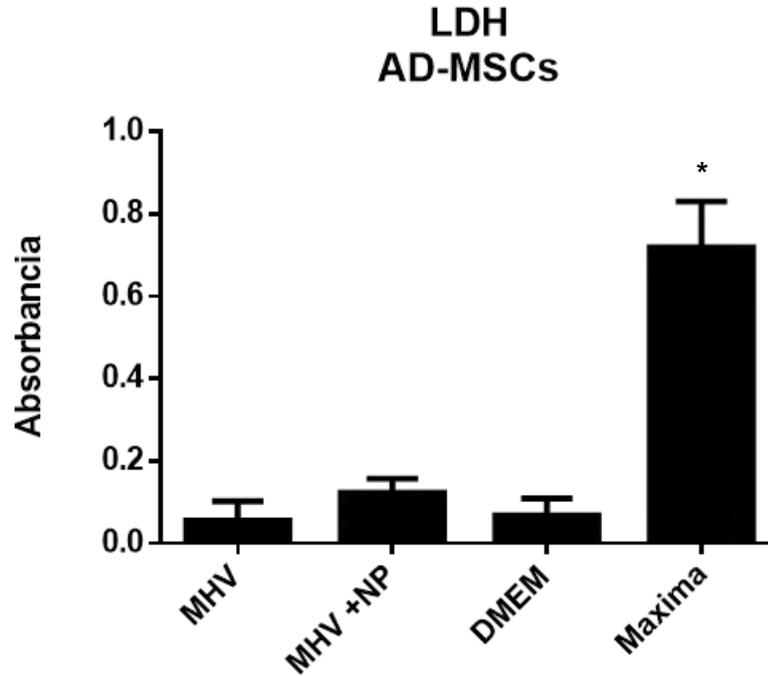
**Figura. 23. Evaluación de la viabilidad celular a través de fluorescencia.** Fibroblastos NIH/3T3 (A-D), MØ Raw/264.7 (E-H) y AD-MSCs (I-L) expuestos a los extractos de MEC. Microfotografías tomadas con un objetivo de 40x.



**Figura.24. Registro de las absorbancias de los ensayos de LDH con M $\phi$ .** Diferencias estadísticamente significativas del grupo de muerte máxima en comparación con los demás grupos. \*P<0.05.



**Figura.25. Registro de las absorbancias de los ensayos de LDH con fibroblastos NHI-3T3.** Diferencias estadísticamente significativas del grupo de muerte máxima en comparación con los demás grupos. \*P<0.05.



**Figura.26. Registro de las absorbancias de los ensayos de LDH con AD-MSCs.** Diferencias estadísticamente significativas del grupo de muerte máxima en comparación con los demás grupos. \*P<0.05.

## 9.6 Activación de Mø con extractos de MEC

Tras 24 horas de exposición a los extractos de MEC se evaluó el perfil de polarización fenotípica del Mø. La cuantificación de citocinas muestra que la MEC de vejiga porcina estimula a los Mø a expresar altas concentraciones de MCP1 y TNF principalmente. También, incrementos en IL-12, IL-10 e IL-6 fueron registrados en comparación al grupo DMEM, además se puede observar que la incorporación de NPs Ag no afecta la producción de citocinas ni modificaron el perfil fenotípico adquirido en respuesta a la MEC (Fig. 27). Así mismo, a través de tinción de las células con hemocolorante rápido se logró apreciar cambios en la morfología celular tras la exposición a la MEC comparado con los Mø del grupo DMEM. Sin embargo esta no fue similar a lo observado en el grupo de Mø estimulados con LPS (Fig. 28-31).

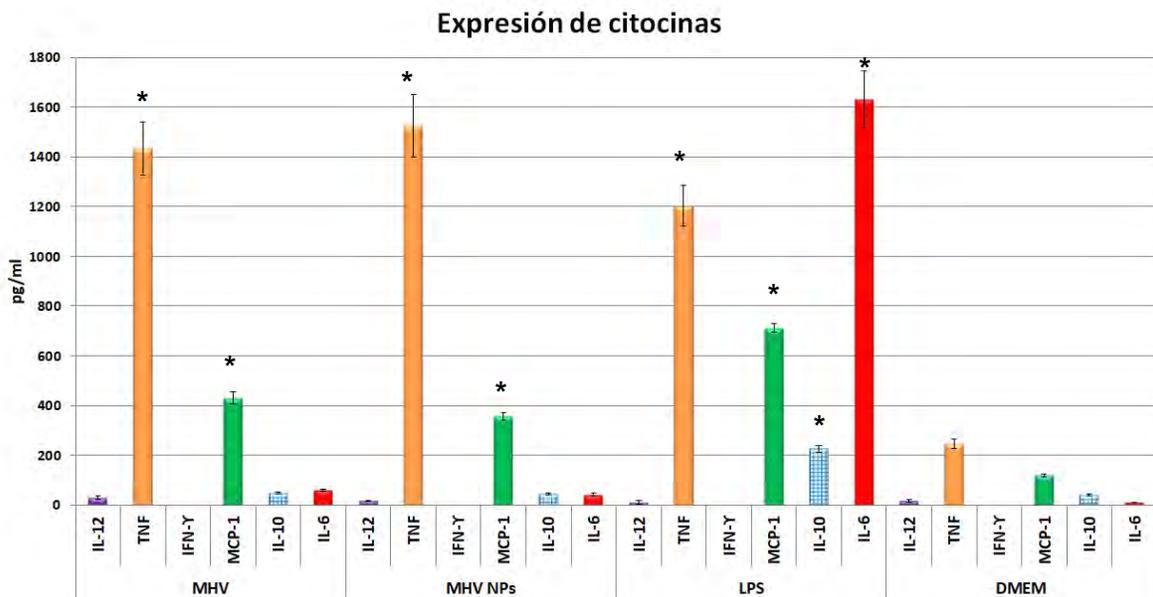
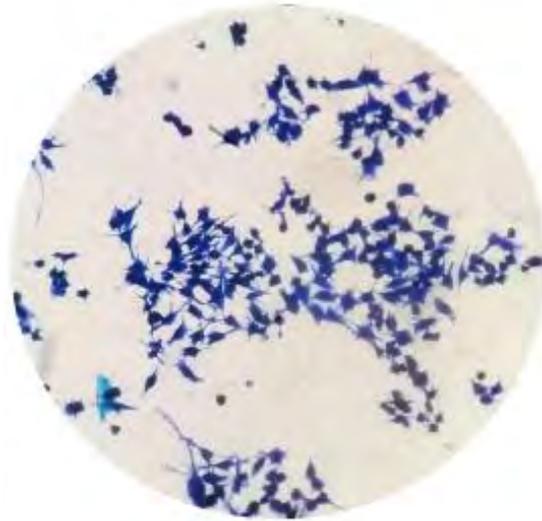
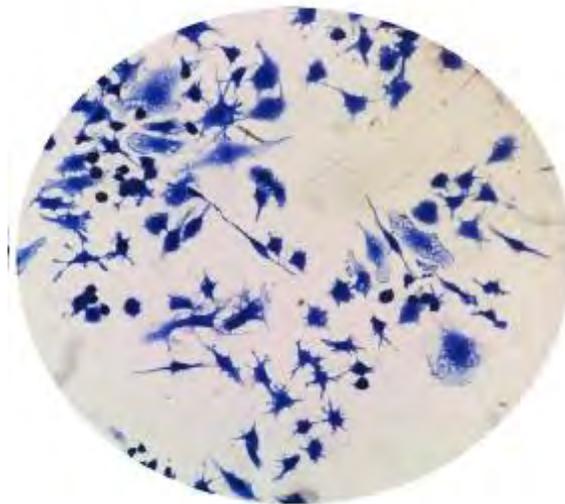


Figura. 27. Cuantificación de citocinas secretadas por los Mø a las 24 h.



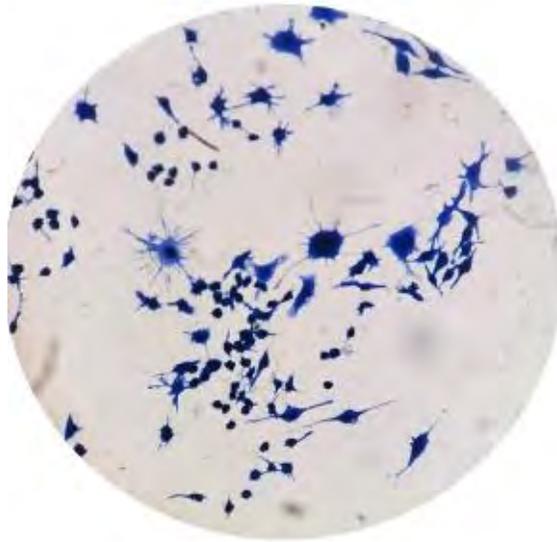
**Figura. 28. Polarización fenotípica del Mø.** Grupo DMEM a las 24 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 40X.



**Figura. 29. Polarización fenotípica del Mø.** Grupo LPS a las 24 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 40X.



**Figura. 30. Polarización fenotípica del Mø.** Grupo MHV a las 24 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 40X.



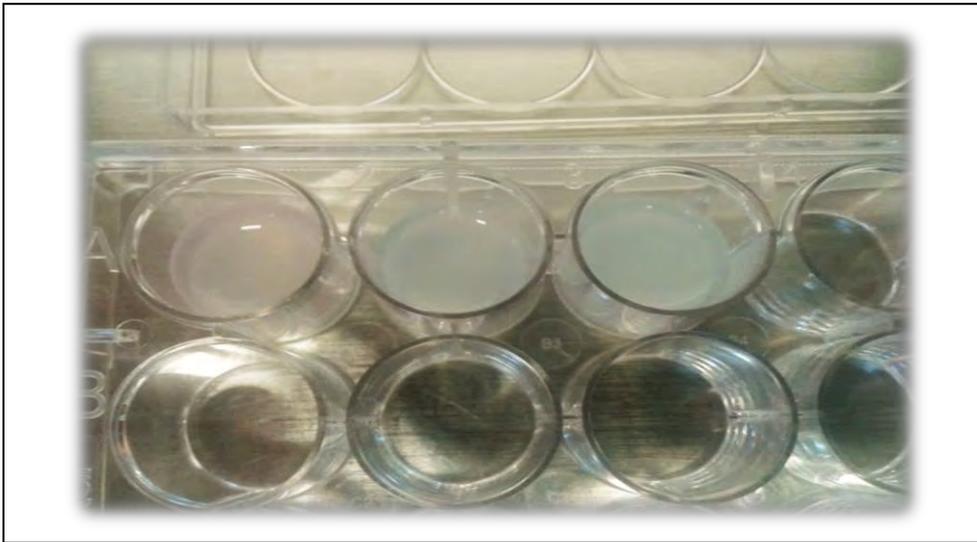
**Figura. 31. Polarización fenotípica del Mø.** Grupo MHV NPs a las 24 h. Imágenes tomadas con un objetivo de 40X.

## 9.7 Obtención de hidrogeles de MEC

Para realizar los ensayos de penetración celular se evaluó la resistencia de los hidrogeles de vejiga de cerdo a la tensión superficial que genera el medio de cultivo sobre éste, se prepararon concentraciones de 10, 15 y 20 mg/ml y se les colocó 1 ml de medio de cultivo (Fig. 32).

Los hidrogeles que fueron preparados a una concentración de 10 mg/ml no lograron soportar el peso del medio de cultivo depositado arriba del mismo y este se mezcló. Por su parte, los hidrogeles de 15 mg/ml tampoco lograron soportar la tensión generada por el medio de cultivo sobre su superficie, aunque en este caso no se desbarató el hidrogel si no que este se desprendió de la superficie de la caja de cultivo. Por el contrario, los hidrogeles con una concentración de 20 mg/ml si soportaron el peso del medio de cultivo sobre ellos (Fig. 33).

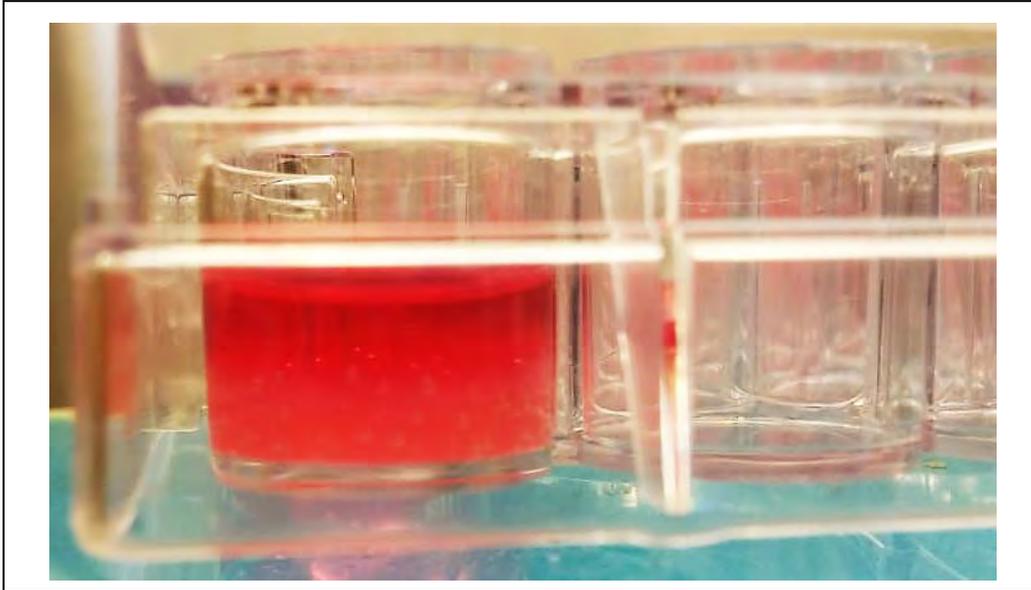
Los hidrogeles de 20 mg/ml lograron gelificar a los 37 °C a partir de los 30 minutos de incubación, presentando una consistencia semisólida capaz de mantener sobre él una capa de medio de cultivo suplementando sin perder su consistencia y permitiendo la filtración del mismo en toda la estructura del hidrogel, facilitando el suministro de nutrientes para las células que lograron penetrar en su estructura (Fig. 34).



**Figura 32. Base de hidrogel de MEC de vejiga en caja de cultivo gelificado para la realización de los ensayos de penetración celular. Andamios de hidrogeles gelificados en cajas de cultivo de 24 pozos.**



**Figura. 33. Determinación de la resistencia de los hidrogeles a la tensión superficial generada por el medio de cultivo. A. Hidrogeles de 10 mg/ml, B. Hidrogeles de 20 mg/ml, C. Hidrogeles de 15 mg/ml y D. Hidrogeles de 20 mg/ml.**



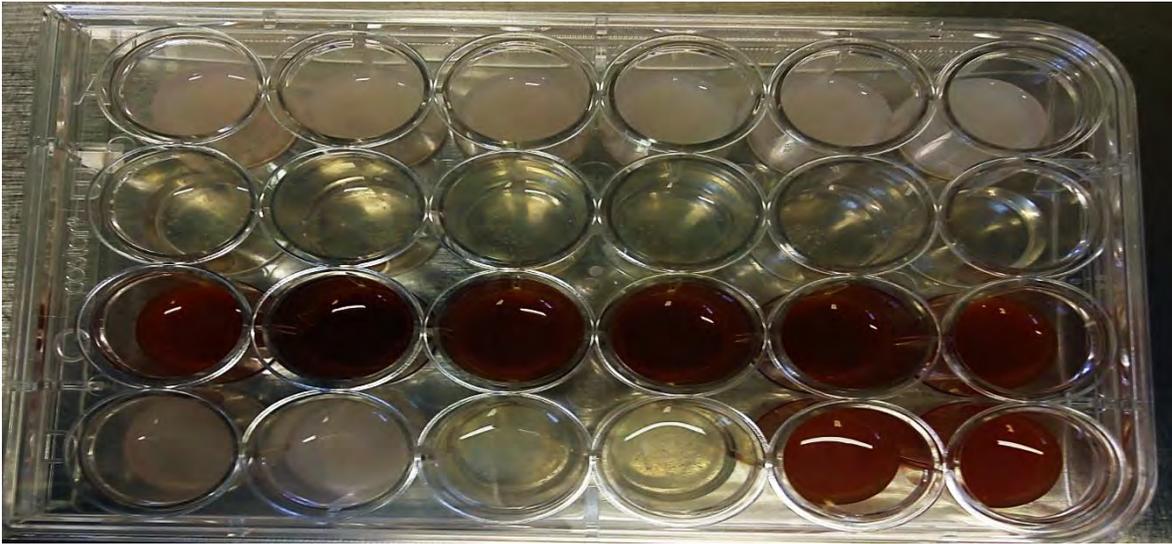
**Figura 34. Hidrogel con medio de cultivo a las 24 horas.** Filtración del medio de cultivo dentro de la estructura del andamio

### **9.8 Adherencia e infiltración celular en hidrogeles de MEC**

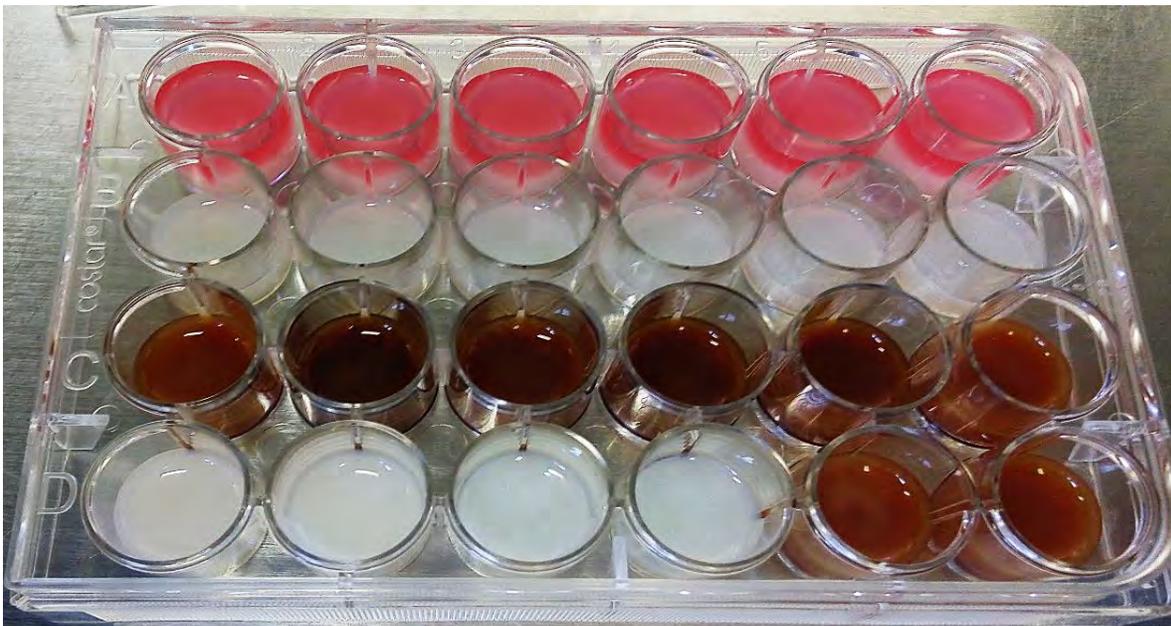
En la figura 35 se observa los hidrogeles antes de su gelificación. Se emplearon hidrogeles de MEC de vejiga a una concentración de 20 mg/ml e hidrogeles de vejiga biofuncionalizados con NPs Ag a una concentración de 125  $\mu$ g/ml, los hidrogeles de vejiga presentaron una tonalidad blanquecina, mientras los hidrogeles biofuncionalizados con NPs Ag una tonalidad oscura.

En la figura 36 se presentan los hidrogeles una vez gelificados y en la figura 37 se aprecia como en todos los hidrogeles lograron soportar el medio de cultivo sobre la superficie inmediatamente después de su gelificación. En esta ocasión los hidrogeles se centrifugaron a 2000 rpm antes de su colocación en la placa de

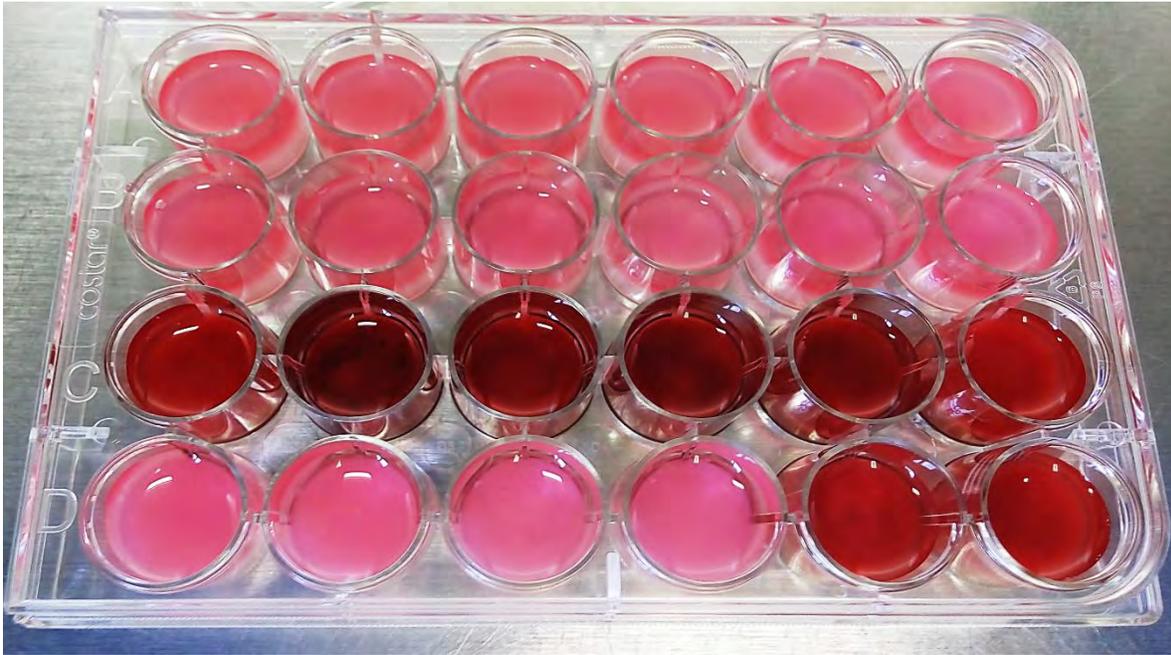
cultivo para eliminar las burbujas observadas en hidrogeles anteriores. Los hidrogeles se fijaron con glutaraldehído (Fig. 38) y como se desprendieron con una cucharilla para su observación en microscopio en fresco (Fig. 39-40).



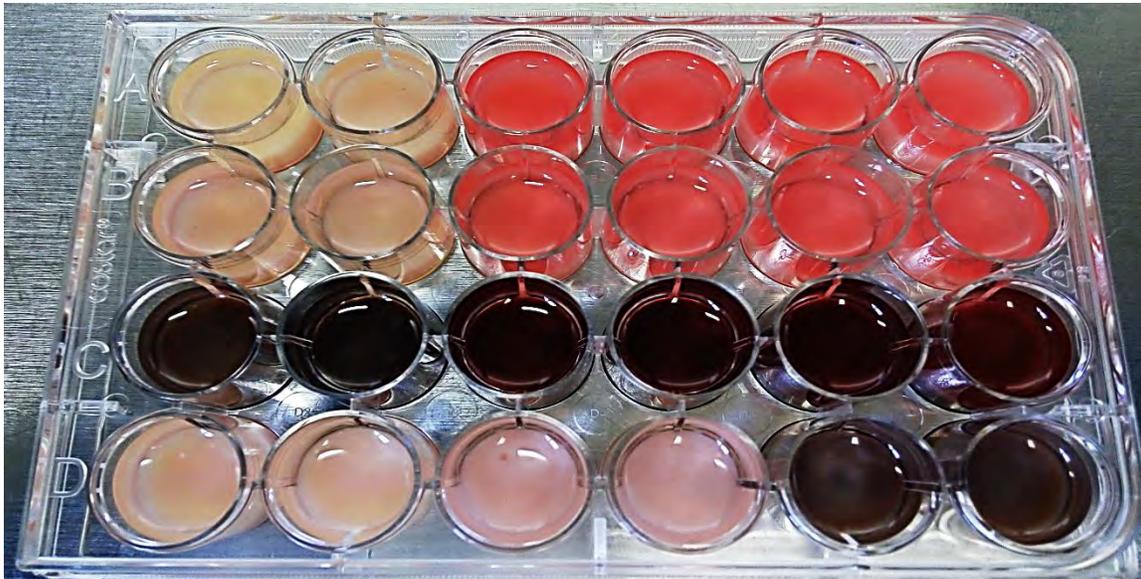
**Figura 35. Colocación de los hidrogeles sobre la caja de cultivo para su gelificación.**



**Figura 36. Hidrogeles gelificados a 37 °C.**



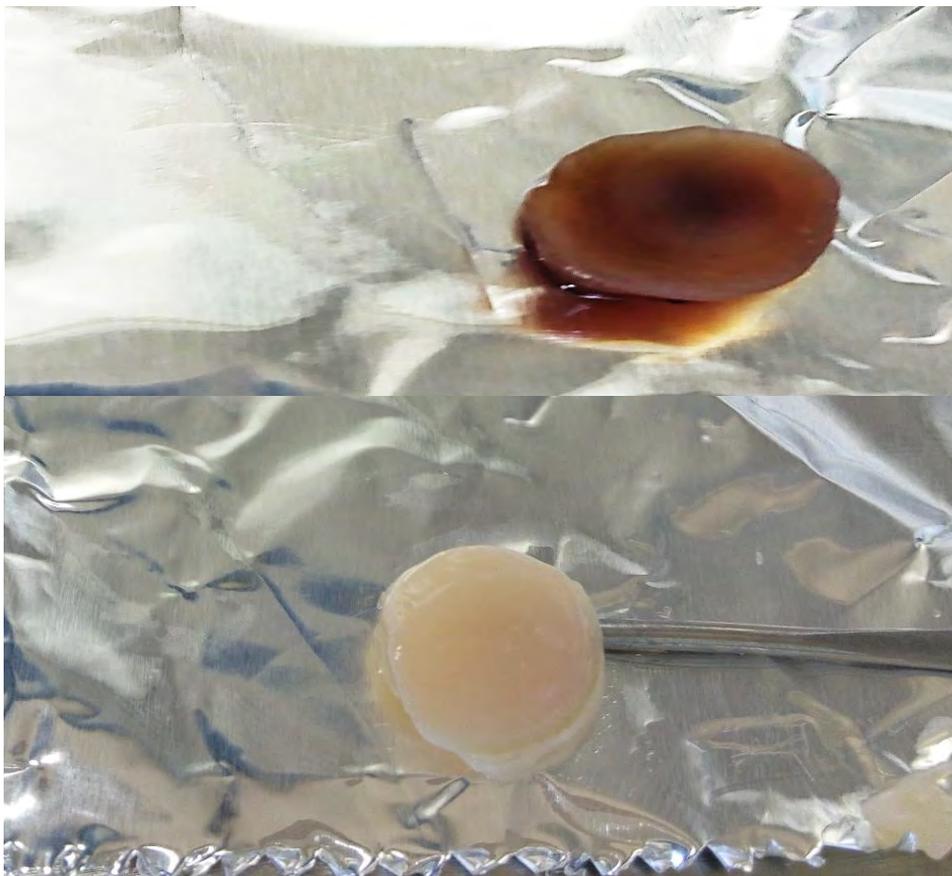
**Figura 37. Colocación del medio de cultivo sobre los hidrogelos.**



**Figura 38. Fijación de los hidrogelos con PBS 1X con glutaraldehído al 4 por ciento.**



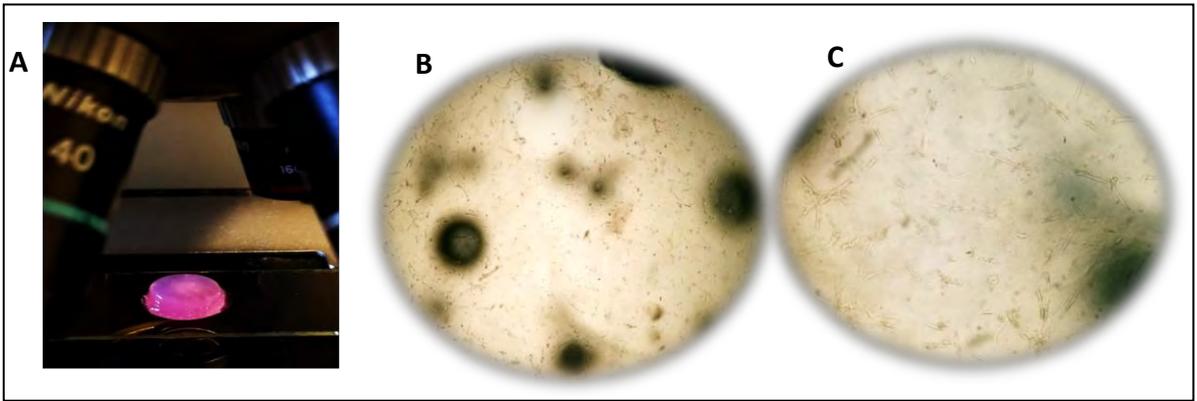
**Figura 39. Desprendimiento del hidrogel de la caja de cultivo tras su fijación.**



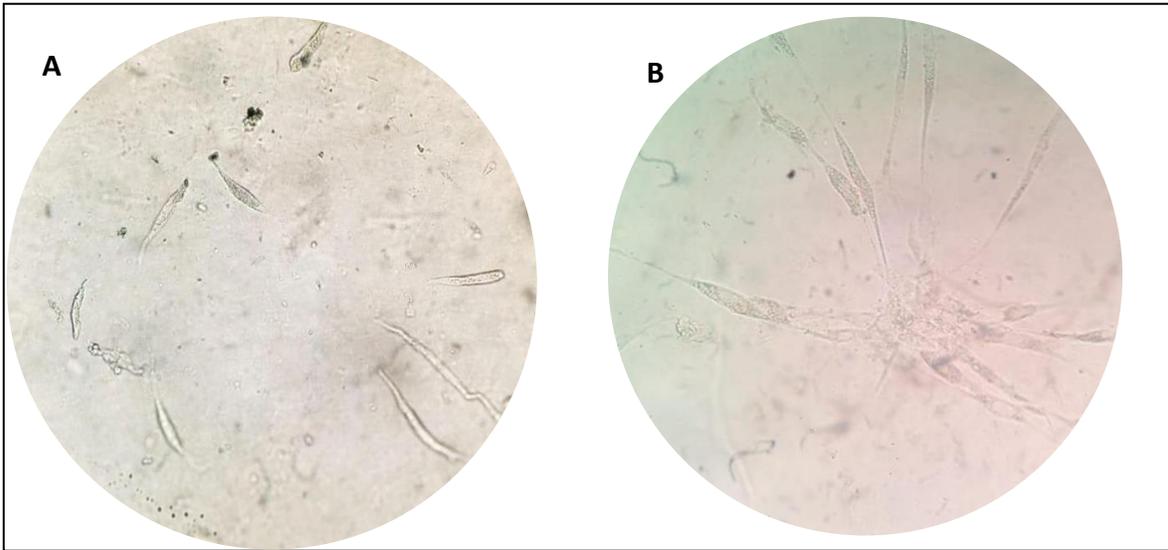
**Figura 40. Hidrogel desprendido de la caja de cultivo.**

Tras 7 días de cultivo sobre los hidrogeles de MEC, se logró observar sobre su superficie una gran cantidad de células con morfología fibroblastoide en una confluencia del 50% del área de cultivo (Fig. 41). Además, pudimos constatar que una parte de las células logró penetrar en el hidrogel y éstas, dentro del hidrogel, exhibían la misma morfología (Fig. 42). También, se observó una sola franja de migración celular o monocapa que se introduce dentro del hidrogel permitiendo el contacto entre las células. Además, al evaluar la colonización celular a los 14 días se logró observar una confluencia del 60% del área de cultivo con la misma morfología fibroblastoide (Fig. 43).

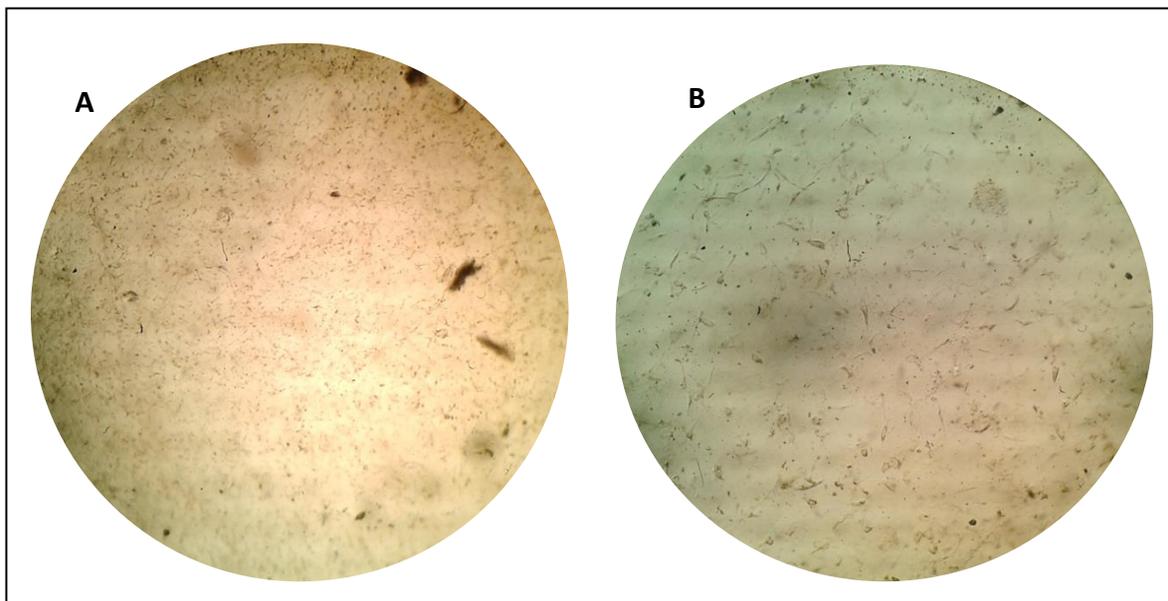
Por su parte, en los hidrogeles biofuncionalizados con NPs Ag las MSCs, observadas en fresco mediante microscopia óptica, se encontraban en aproximadamente un 40 % de confluencia celular sobre la superficie del andamio, presentando morfología fibroblastoide (Fig. 44 y 45). Sin embargo, se dificultó apreciar las células debido a que los hidrogeles toman una coloración oscura que dificulta monitorear, a través del microscopio, la visualización de las células. Posteriormente, se realizó un corte transversal de los hidrogeles biofuncionalizados y se logró apreciar las células con más claridad penetrando en el hidrogel (Fig. 46- 47).



**Figura 41. Microfotografías de las AD-MSCs sobre el hidrogel de MEC de vejiga de cerdo.** A. Hidrogel de MEC de vejiga de cerdo removido de la caja de cultivo. B. AD-MSCs en superficie 4X. C) MSCs en superficie 10X a los 7 días de evaluación.



**Figura 42. Microfotografías de las AD-MSCs que penetraron en el hidrogel de MEC de vejiga de cerdo. Observación en microscopio óptico de campo claro a 40x.**



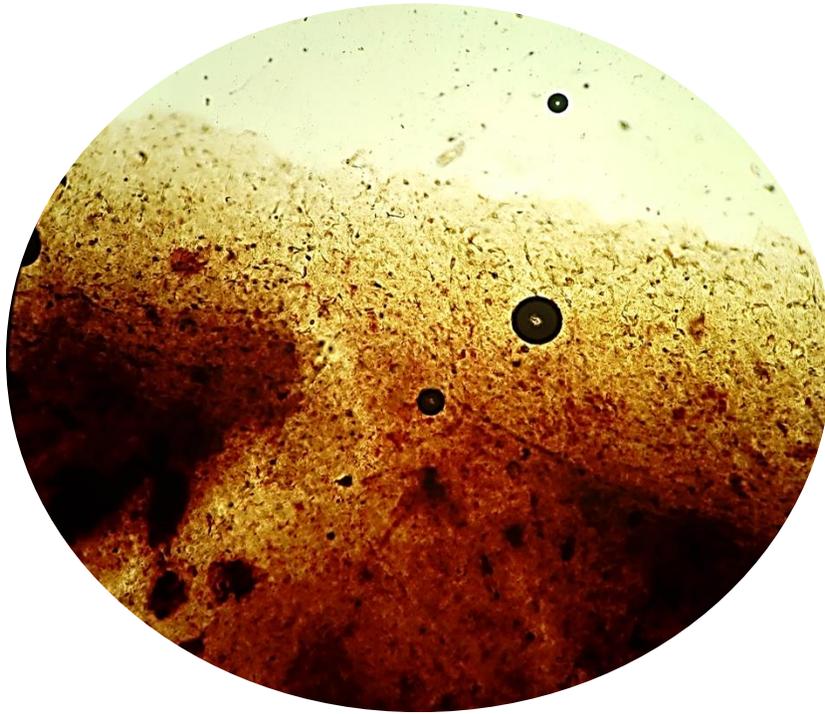
**Figura 43. AD-MSCs sobre la superficie del hidrogel a los 14 días de evaluación. Microfotografías realizadas con un objetivo de 4x A) y 10x B) de las.**



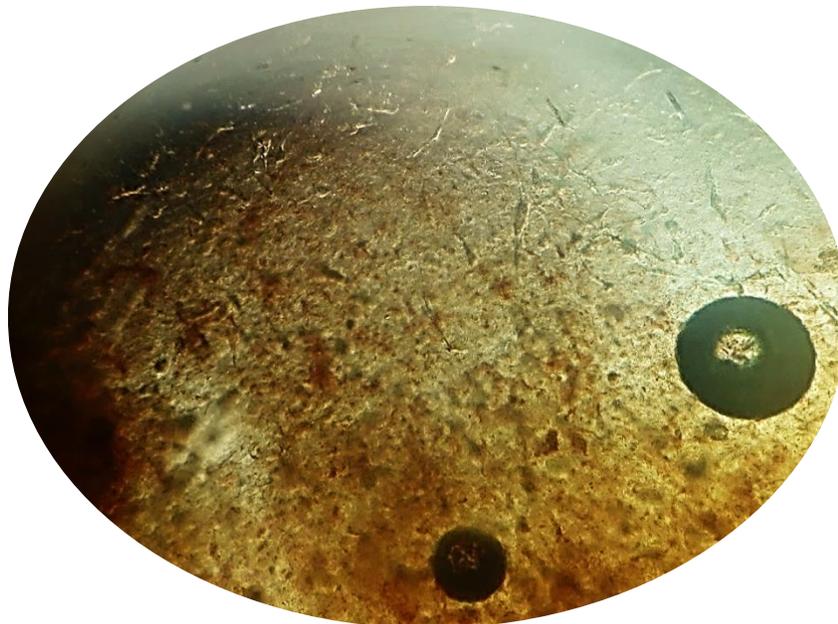
**Figura 44. Adherencia AD-MSCs a los 3 días de cultivo.** Observación en fresco de la superficie del hidrogel con NP Ag. Microfotografía tomada con un objetivo de 4X.



**Figura 45. Adherencia MSCs a los 3 días de cultivo.** Observación en fresco de la superficie del hidrogel con NP Ag. Microfotografía tomada con un objetivo de 10X.

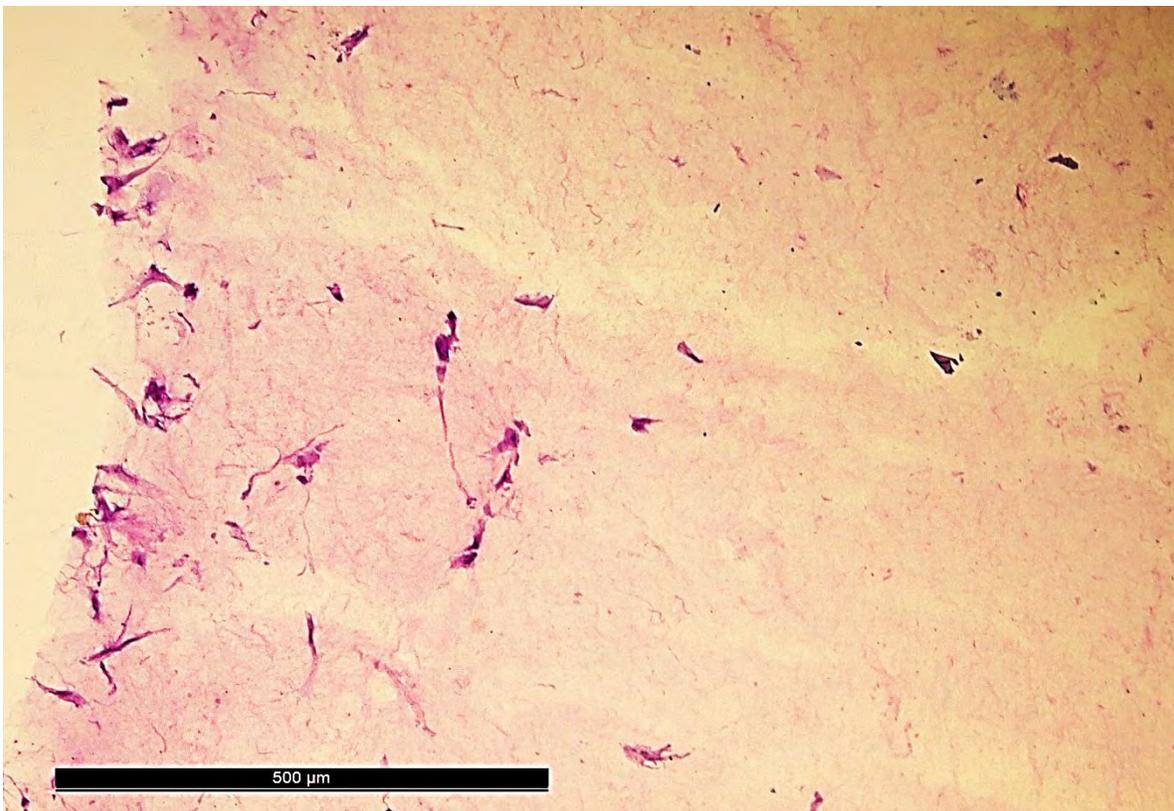


**Figura 46. Penetración MSCs a los 3 días de cultivo.** Observación en fresco de un corte transversal del hidrogel con NP Ag. Microfotografía tomada con un objetivo de 4X.



**Figura 47. Penetración MSCs a los 3 días de cultivo.** Observación en fresco de un corte transversal del hidrogel con NP Ag. Microfotografía tomada con un objetivo de 10X.

Por su parte, a partir de la preparación de los cortes histológicos pudimos constatar que las células del grupo MHV llegaron a penetrar aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , presentando la misma morfología fibroblastoide (Fig. 48). Por su parte, en el grupo de MHV-NPs no se logró un corte histológico donde se aprecie la infiltración de las células en el hidrogel. Al momento de congelar el hidrogel el material tornó a una textura de cristal impidiendo obtener cortes histológicos debido a la fragmentación de la muestra.



**Figura 48. Histología de los ensayos de penetración celular.** Cortes histológicos de 90  $\mu\text{m}$  de grosor de los hidrogeles con MSCs-AD a los 14 días de penetración teñidos con H&E.

## 9.9 Análisis de la biocompatibilidad *in vivo*

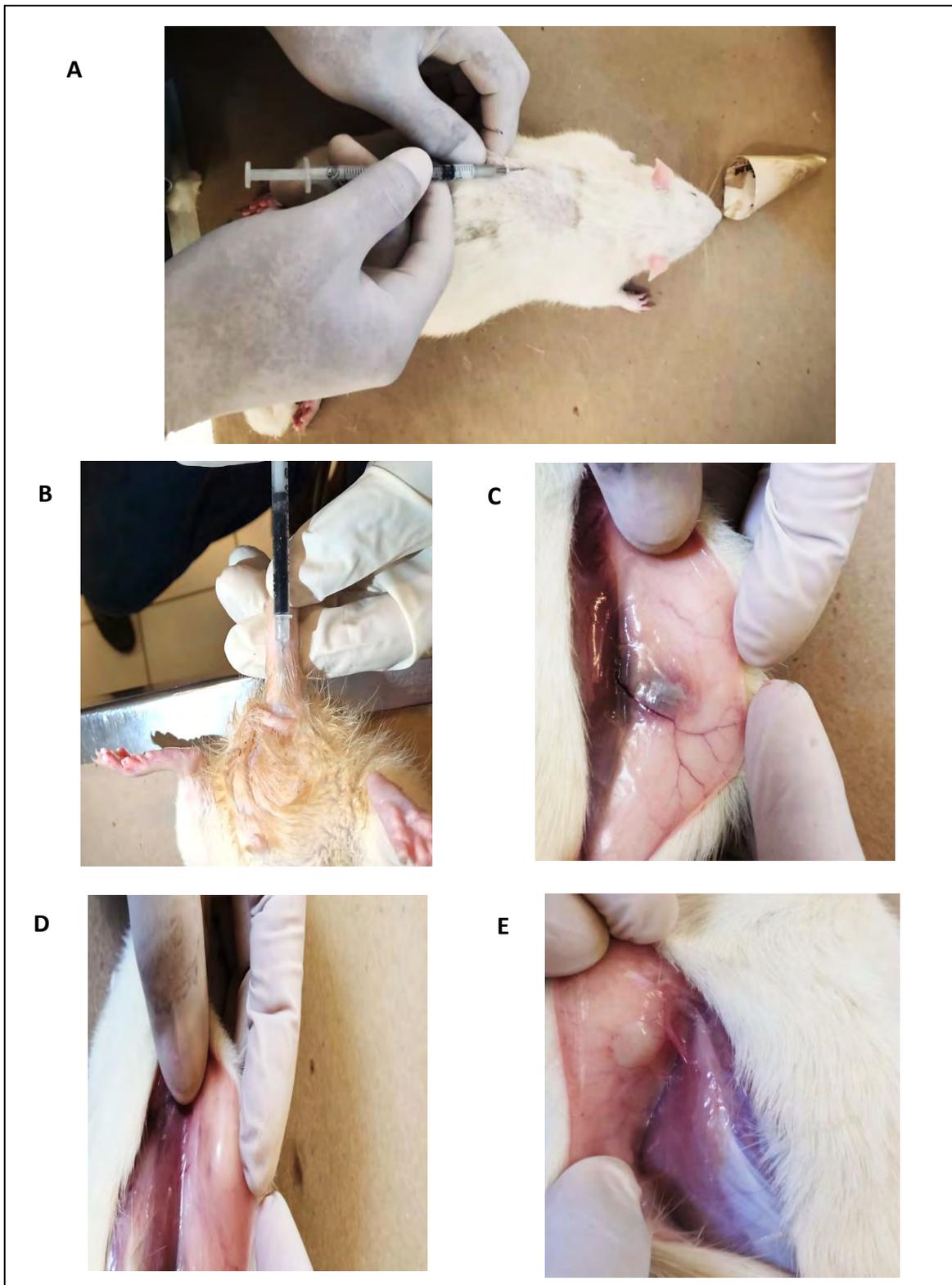
Para evaluar la biocompatibilidad de los materiales *in vivo* se empleó el colorante de azul de Evans. Este colorante puede inyectarse de manera intravenosa y donde exista infiltrado leucocitario éste se extravasará en la zona del tejido donde se está llevando a cabo la infiltración de los componentes inflamatorios tiñendo el tejido de color azul.

24 horas después de la inoculación del hidrogel (Fig. 49. A), la rata se anestesió en una cámara de gas con cloroformo y se le aplicó la solución de azul de Evans en la vena caudal (Fig. 49.B), 30 minutos después se sacrificó y se realizó un corte a través de la línea media del dorso. Por debajo de la piel de la zona inoculada con cloroformo, se logró observar la pigmentación con azul de Evans, la zona se encontraba necrótica y dura al tacto (Fig. 49 C). Por el contrario, en la zona de inoculación de la solución salina (Fig. 49 D) y el hidrogel (Fig. 49 E) no se observó la presencia de azul de Evans ni signos de necrosis o inflamación del tejido.

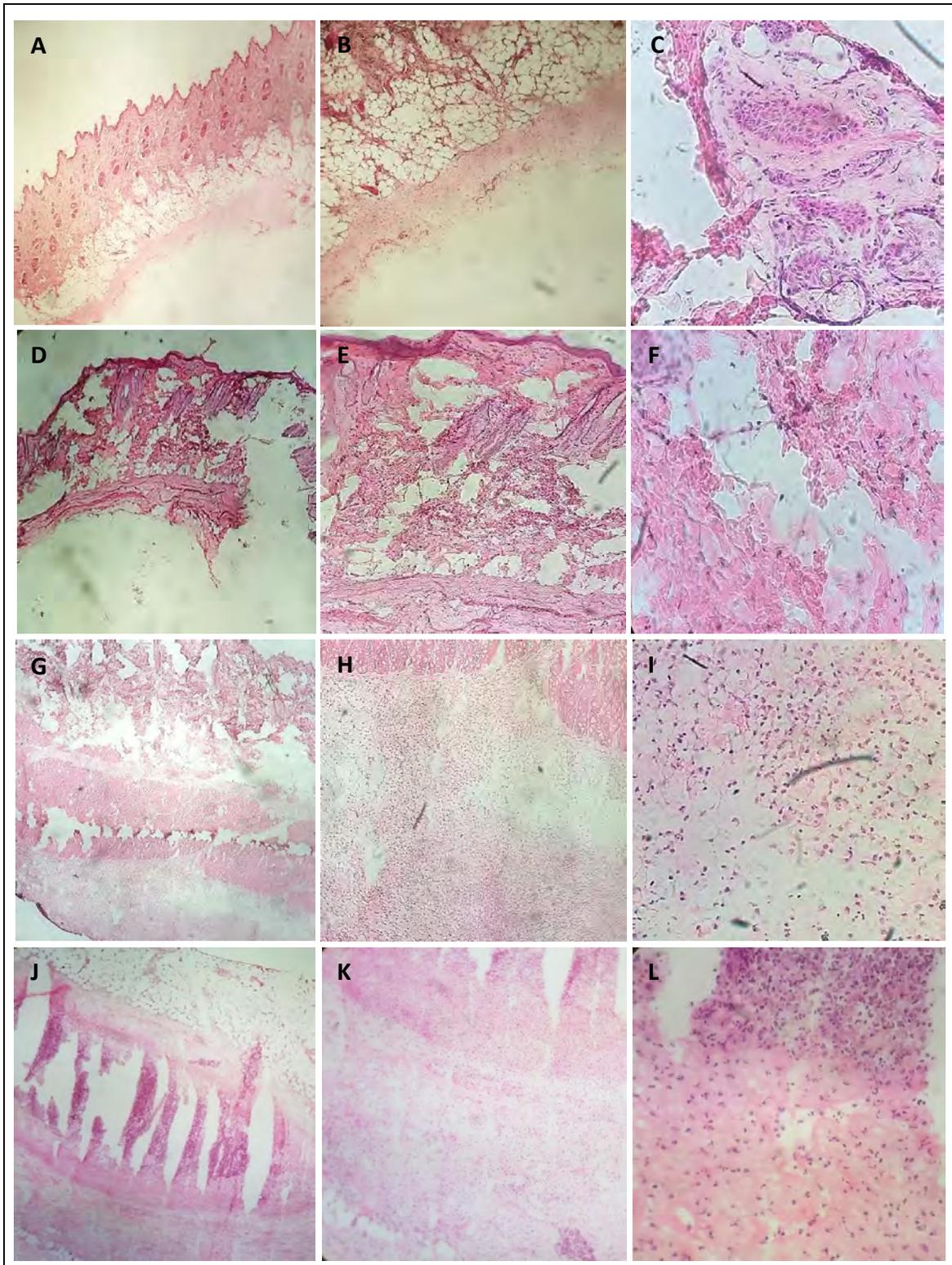
Por su parte, en los cortes histológicos se puede observar que el hidrogel de MEC es biocompatible y la funcionalización con NPs Ag al parecer no alterara los resultados, ya que se observan de manera muy similar en comparación con los grupos control (Fig.50). Como control negativo se empleó H<sub>2</sub>O y en este grupo de prueba las características que se observaron del tejido fueron una delgada capa de epitelio cubriendo un tejido conectivo denso, por debajo a esta zona se encuentra el tejido adiposo seguido de la presencia de tejido muscular estriado. Por último, se encuentra también un delgado septo de tejido conectivo con escasa

presencia celular (Fig.50. A-C). Mientras que en el control de prueba positivo con cloroformo se encontró un tejido con la zona de tejido conectivo y adiposo degradado. También se pudo observar poca presencia de infiltrado leucocitario en la zona del septo de tejido conectivo (Fig.50. D-F).

En cambio en el grupo MHV, se observa el hidrogel de aspecto fibrilar desorganizado por debajo del tejido muscular con presencia de diversos linajes celulares entre ellos células del sistema inmunológico, que se destaca por un infiltrado leucocitario compuesto principalmente de células plasmáticas, linfocitos y M $\phi$ . Así mismo, están presentes algunas células con apariencia fibroblastoide (Fig.50. G-I). En el grupo MHV-NPs se observan condiciones muy similares de composición del tejido y de infiltrado leucocitario presente dentro de los hidrogeles (Fig.50. J-L).



**Figura.49. Sacrificio de las ratas Wistar para el análisis de biocompatibilidad.** A. Inoculación subdérmica de hidrogel. B. Colocación de azul de Evans intravenoso. C. Control positivo cloroformo. D. Control negativo solución salina. E. Hidrogel de vejiga.



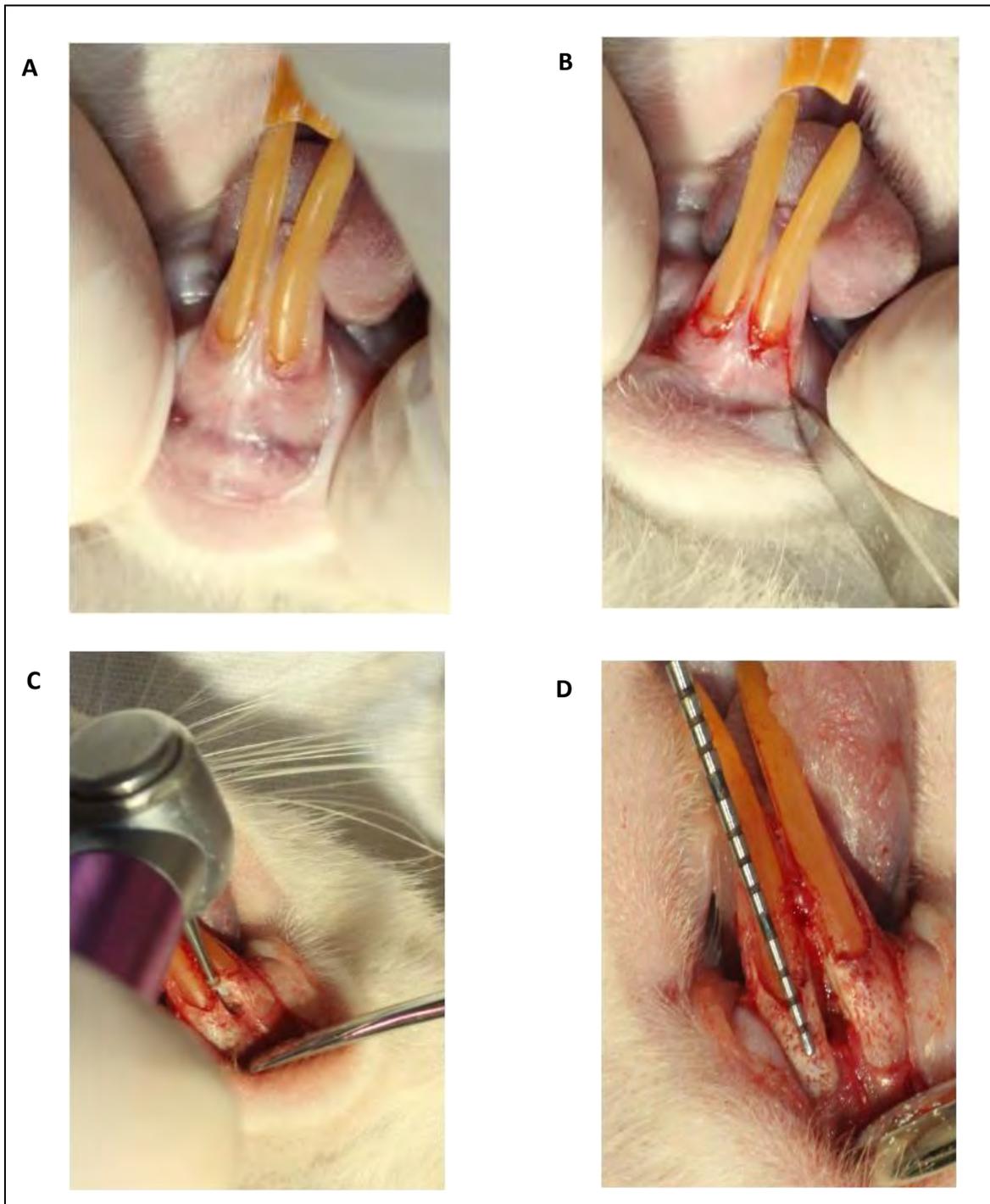
**Figura.50. Histología de los implantes de hidrogeles de MEC.** Control negativo DMEM (A-C). Control positivo cloroformo (D-E). Grupo MHV (G-I) y grupo MHV-NPs (J-L). Microfotografías tomadas con un objetivo de 4X, 10X y 40X.

## 9.10 Análisis del modelo *in vivo* en ratas Wistar

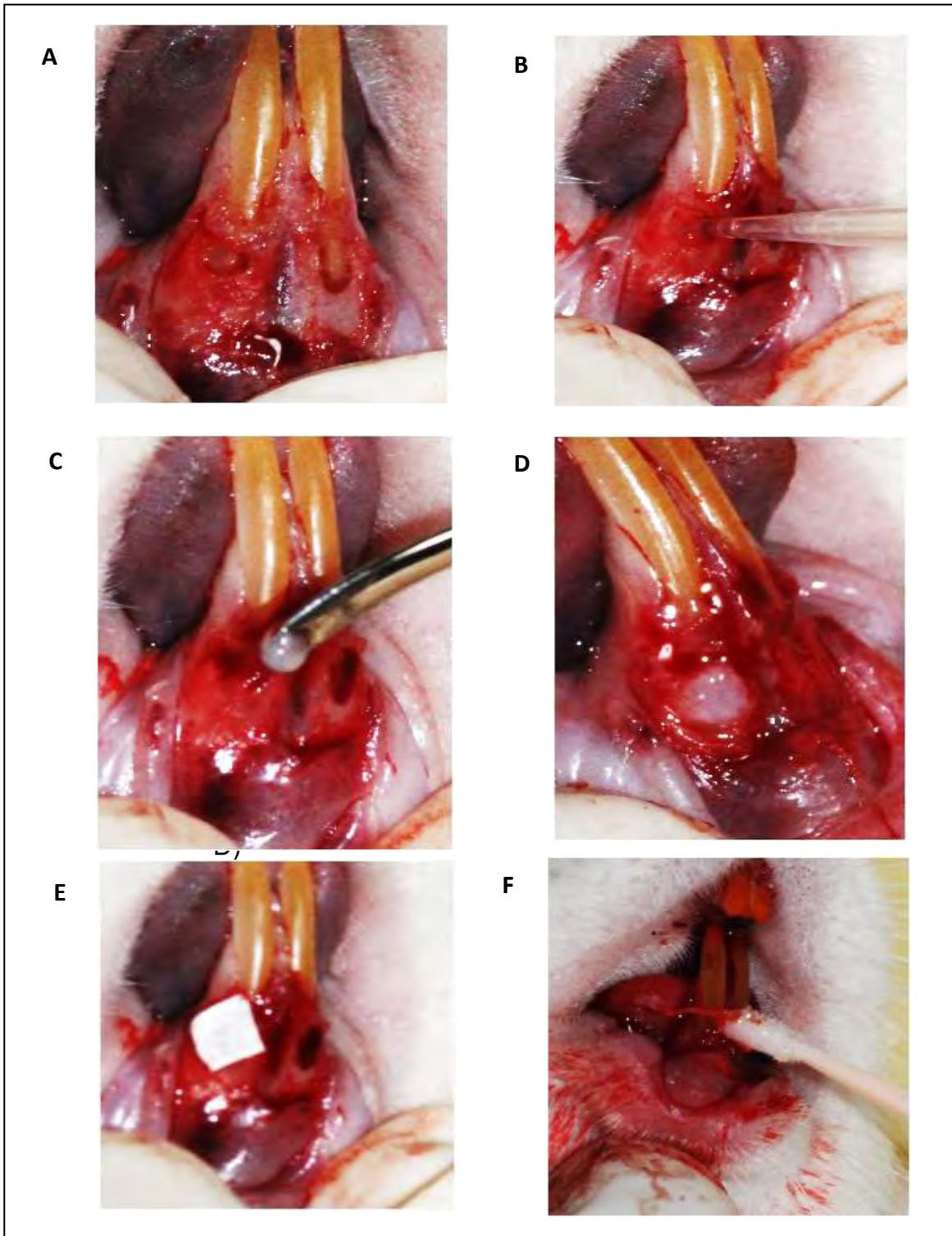
Se logró desarrollar una metodología rápida para la generación de un defecto óseo de manera mecánica para su uso en los ensayos de regeneración. Se colocó la MEC en forma de hidrogel y se contaminó de manera deliberada con bacterias viables de *E. feacalis* o LPS de *E. coli* y *S. typhimurium* antes de suturar la herida. De esta manera, se logró producir un defecto óseo circular y cóncavo de aproximadamente 2 mm en los incisivos inferiores de las ratas (Fig. 51). También se logró biocontaminar y colocar el hidrogel sobre el defecto óseo producido (Fig. 52).

La técnica para producir el defecto óseo resultó en un defecto rápido y visible, lo cual para nuestros fines de colocar el andamio de MEC nos resultó conveniente. A los 30 días se sacrificaron las ratas y se evaluó el potencial regenerativo. En aquellos defectos óseos donde se colocó LPS y no se colocaron los hidrogeles se observó un defecto de similar tamaño al realizado y no se observó un aumento en el tamaño de la lesión, así como tampoco signos de regeneración del tejido, así mismo se pudo observar que la colocación de LPS sobre el daño mecánico no indujo la presencia de infiltrado inflamatorio (Fig. 53 y 54). Así mismo, en el grupo donde se colocaron bacterias se logró observar resorción ósea aumentando el tamaño del defecto realizado (Fig. 55). Por su parte, en todos los grupos donde se colocó el hidrogel se pudo observar la presencia de un tejido tipo cartilaginoso el cual cubría la zona del defecto óseo y el andamio se incorporó al tejido circundante sin la presencia de exudado supurativo (Fig. 53-55). A través de los cortes histológicos se pudo determinar la presencia de infiltrado inflamatorio,

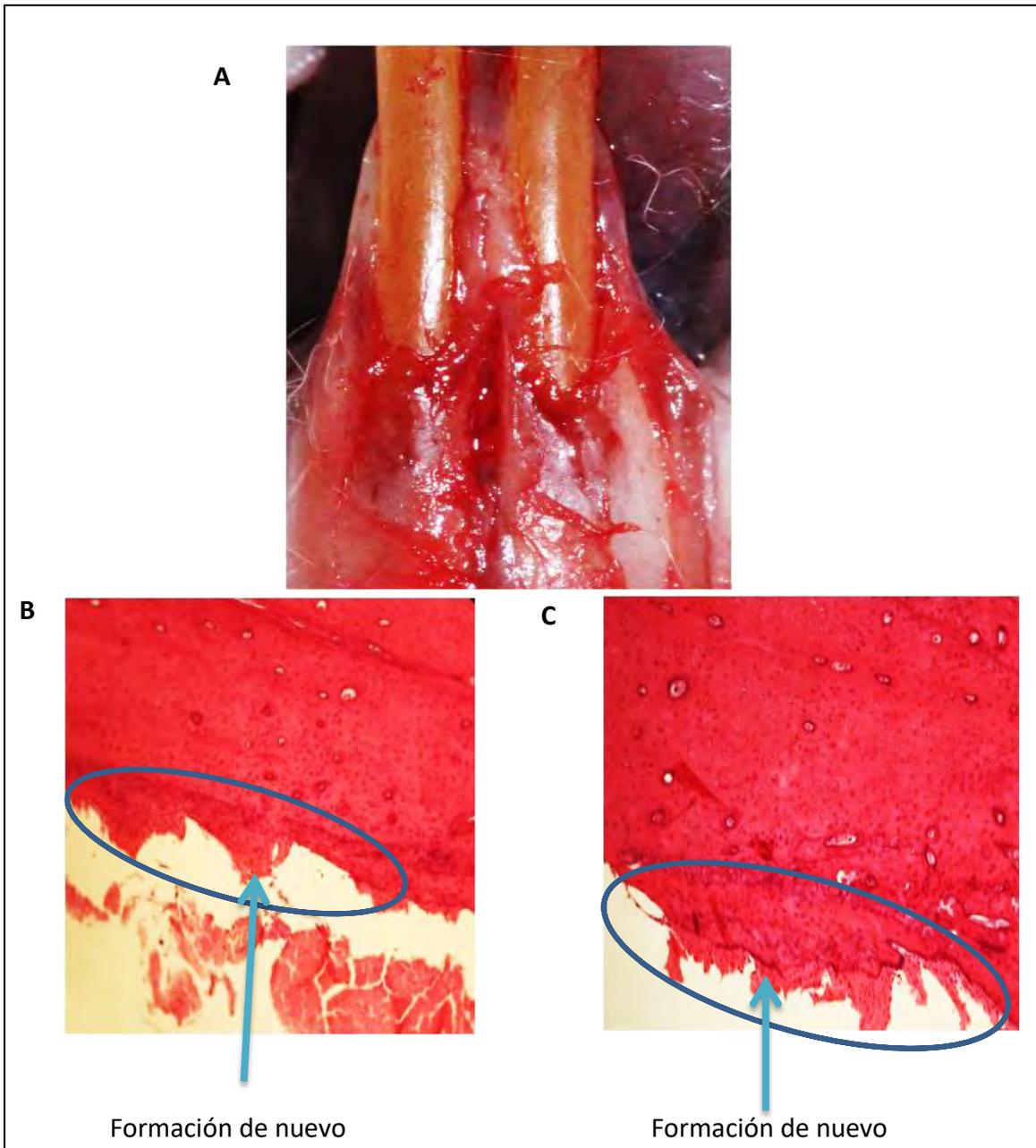
principalmente de neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y la formación de células gigantes multinucleares. Así como también la presencia de condrocitos y la formación de grupos isógenos en proceso de osificación (Fig. 55).



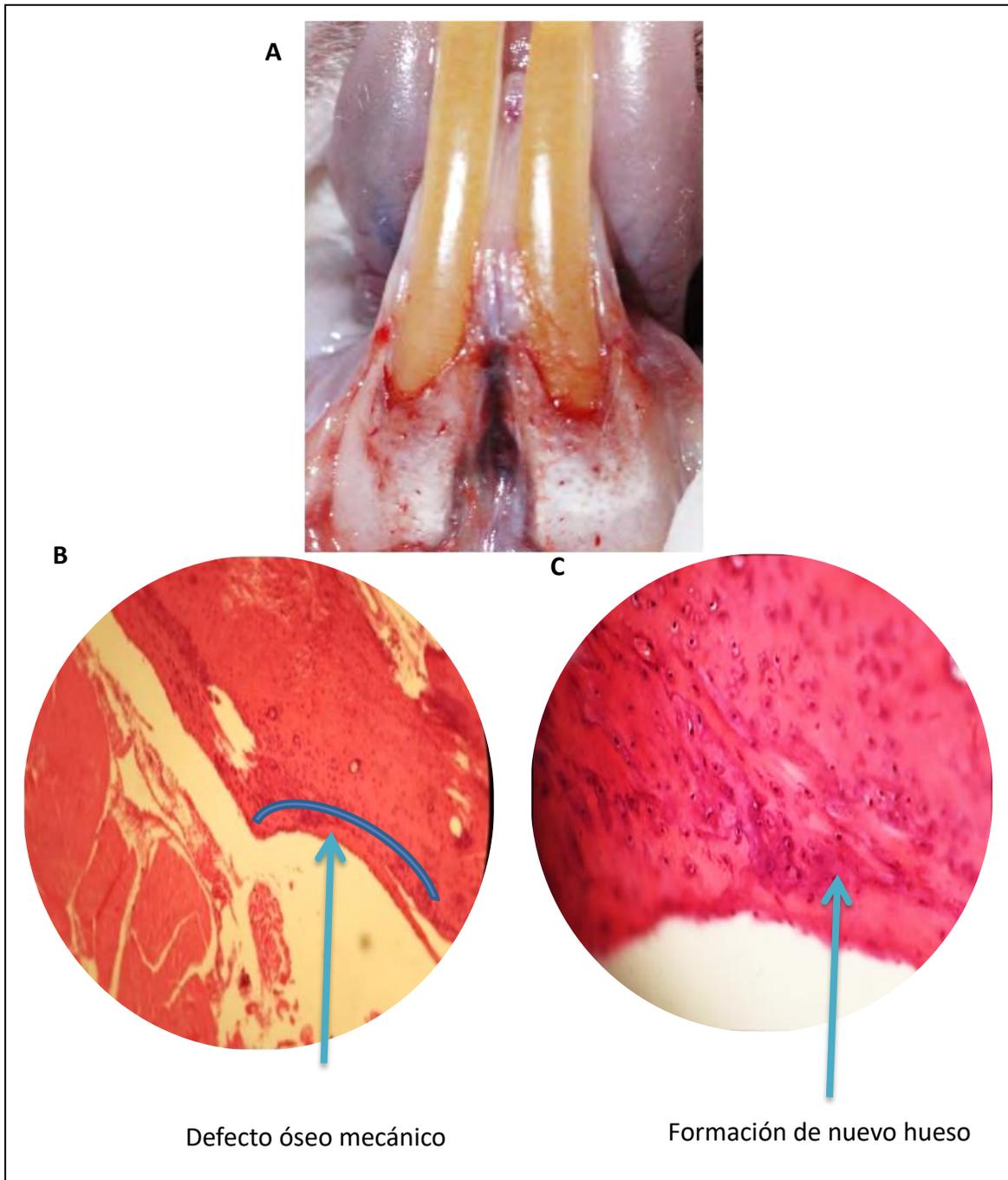
**Figura 51. Formación de defecto óseo en ratas Wistar de aproximadamente 2 mm de diámetro. A. Encía sin intervención. B. Corte con hoja de bisturí para desprendimiento de la encía. C. Remoción del hueso con una fresa. D. Evaluación del defecto con una sonda periodontal.**



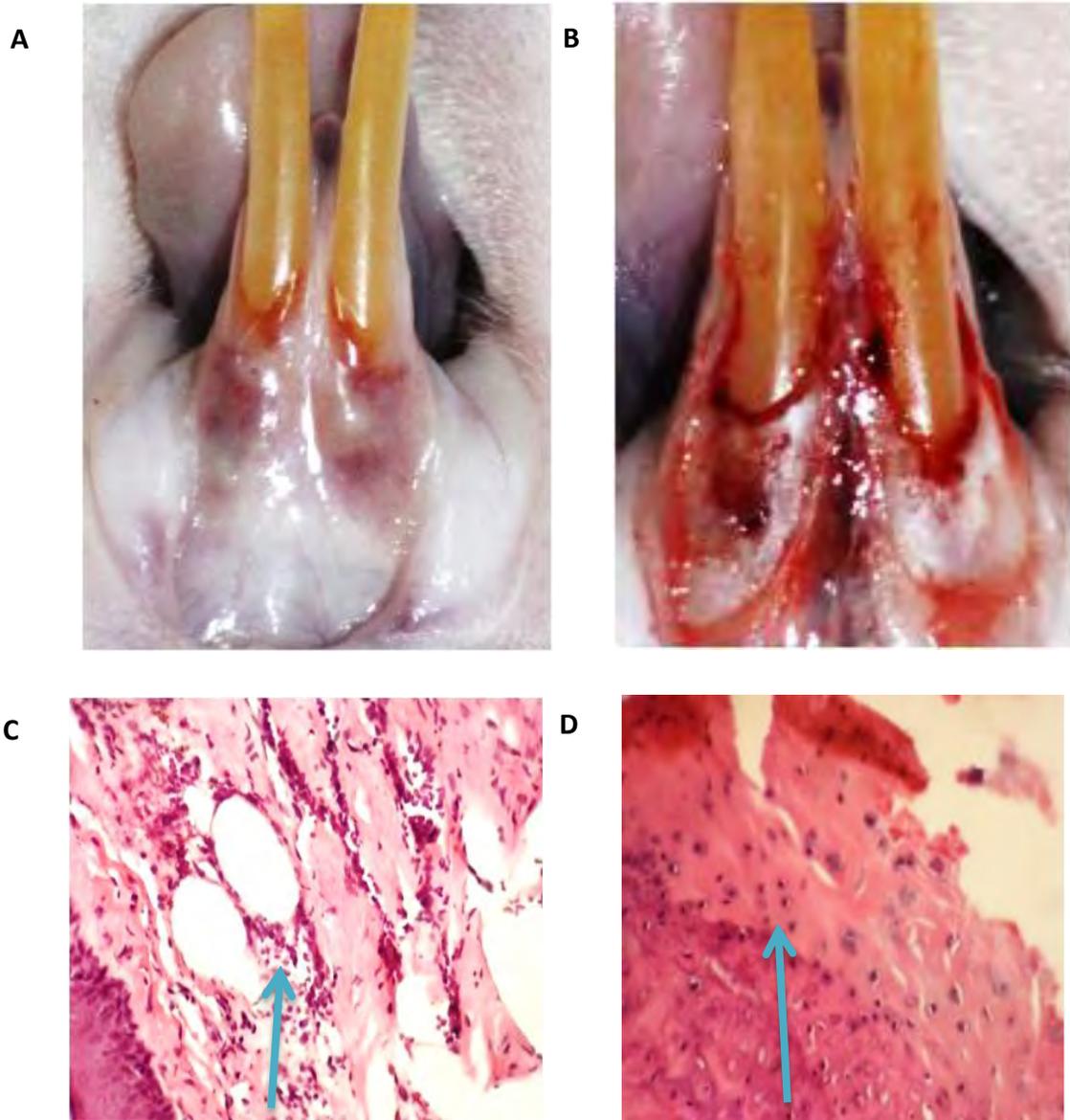
**Figura.52. Defecto óseo mecánico biocontaminado con LPS de *S. thypimurium*, *E. coli* o *E. feacalis* con hidrogel y membrana de MEC. A. Defecto óseo. B. Colocación de LPS o bacterias. C y D. Colocación hidrogel. E. Colocación membrana. F. Reposicionamiento del tejido gingival.**



**Figura.53. Fotografías y microfotografías del modelo de regeneración con defecto óseo mecánico y LPS de *E. coli*.** A. 30 días después de la inoculación. Tras desprender el tejido gingival no se observó exudado supurativo ni degradación de hueso. B y C. Producción de hueso nuevo.



**Figura.54. Fotografías y microfotografías del modelo de regeneración con defecto óseo mecánico y LPS de *S. typhimurium*. A. 30 días después de la inoculación. Tras desprender el tejido gingival no se observó exudado supurativo ni degradación de hueso. B y C. Producción de hueso nuevo.**



**Figura.55. Fotografías y microfotografías del modelo de regeneración con defecto óseo mecánico biocontaminado con *E. faecalis*.** A. 30 días después de la inoculación. B. Tras desprender el tejido gingival no se observó exudado supurativo ni degradación de hueso. C. Presencia de infiltrado inflamatorio. D. producción de hueso nuevo.

### 9.11 Análisis de los ensayos de actividad antibacteriana

Los ensayos de microdiluciones para conocer la concentración mínima inhibitoria de la MEC funcionalizada con NPs Ag mostraron que *Enterococcus faecalis* presenta sensibilidad en un rango de concentraciones que van desde los 134 y 67  $\mu\text{g/ml}$ . Para nuestra sorpresa, la MEC sin NPs Ag mostró una mayor capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano en comparación con las MEC con NPs Ag a las 24 horas de evaluación (Fig. 56). Por su parte, los resultados de los ensayos de inhibición radial muestran que los hidrogeles de MEC polimerizada no es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, mientras que los hidrogeles de MEC funcionalizados con 100  $\mu\text{g/ml}$  de NP Ag lograron exhibir un potencial inhibitorio mínimo formando un pequeño halo de inhibición. Por su parte, los hidrogeles que fueron funcionalizados con penicilina y estreptomicina como control de inhibición mostraron un potencial inhibitorio contundente sobre el crecimiento bacteriano (Fig.57).



**Figura 56. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los compuestos.** Cultivo de *E. faecalis* a las 24 horas de incubación mostrando las concentraciones mínimas inhibitorias de los hidrogeles MHV, MHV NPs Ag y el control de clorhexidina.

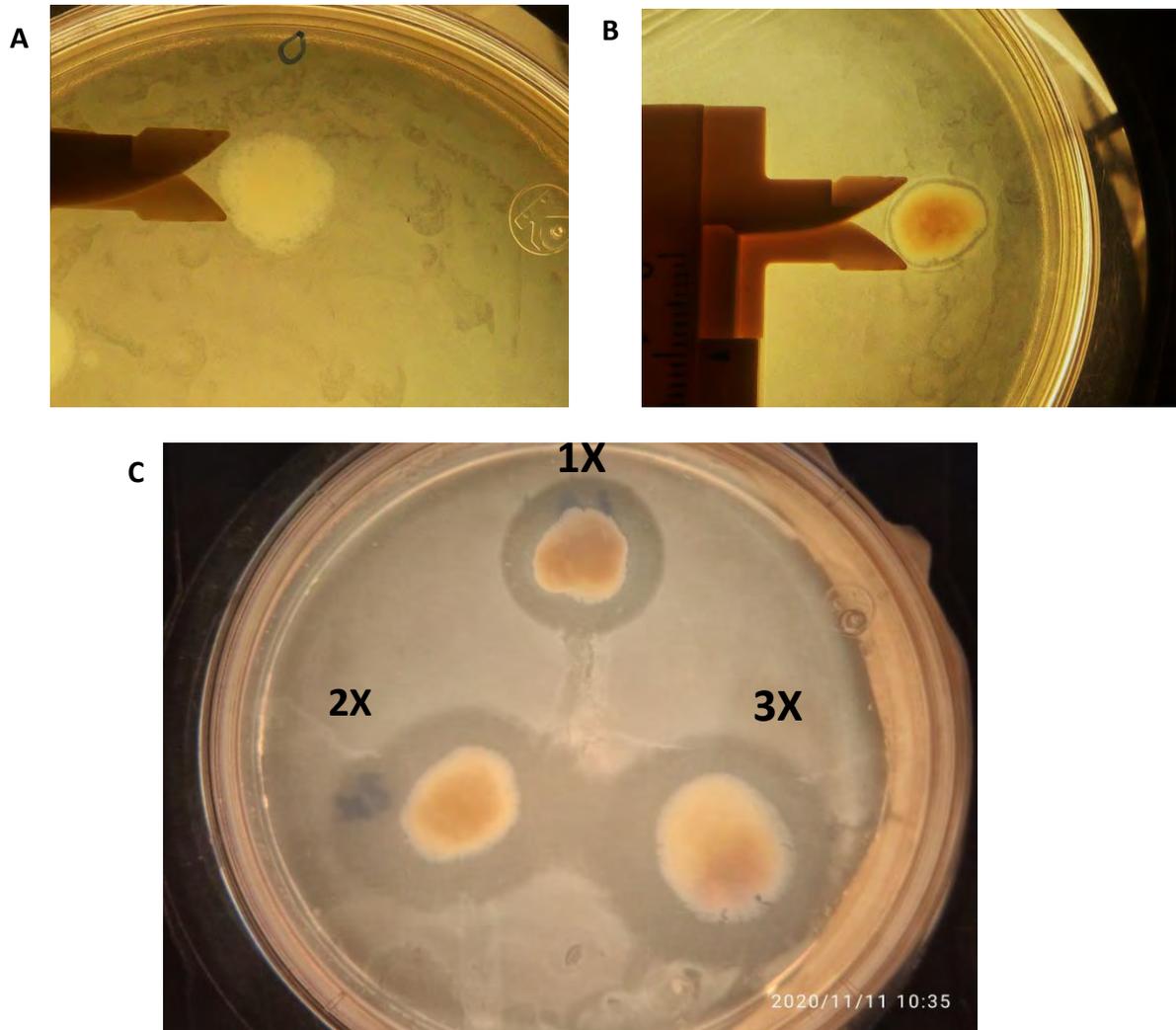


Figura 57. Potencial inhibitorio de los hidrogeles sobre cultivo de *E. faecalis*. A. MHV B. MHV NPs Ag. C. Control de inhibición con penicilina y estreptomina.

## X. DISCUSIÓN

EL colágeno es uno de los principales constituyentes de la MEC, aproximadamente un 90% de proteínas. Esta proteína es responsable de la formación de la mayoría de sus fibras estructurales, de establecer conexión con los demás componentes de la MEC facilitando el auto ensamblaje tridimensional, además este entrecruzamiento de fibras forma un material poroso que permite el tránsito y establecimiento de células (Halper, 2021). En esta investigación se logró determinar a través de métodos electroforéticos en geles SDS-PAGE la separación e identificación de proteínas de la MEC determinando que esta contiene principalmente colágeno tipo I. Además, también se logró realizar el reconocimiento de colágeno a través de métodos bioquímicos para su identificación. Aunque, se ha reportado que entre las principales proteínas que componen la MEC de vejiga urinaria porcina son el colágeno tipo IV y la elastina.

Para la producción de los hidrogeles, la digestión de las fibras colágenas y no colágenas de la MEC se realizó durante 24 h hasta cuando desaparecieran las fibras visibles al microscopio. Se ha reportado que los tiempos de digestión cortos de la MEC están relacionados con células más viables, con un desplegamiento morfológico acorde al tipo celular siendo colonizada por una gran cantidad de células tipo fibroblásticas y células endoteliales vasculares en comparación con los hidrogeles preparados a partir de digestiones de 48 o 72 h, donde se puede observar una disminución en la viabilidad celular y pérdida de la morfología

celular. Así mismo, los efectos de las digestiones mayores a las 24 h inciden en el promedio del diámetro de las fibras proteicas y en una disminución en la interconectividad de estas en la formación del hidrogel (Pouliot et al., 2020).

También, se ha demostrado que dependiendo de la concentración de colágeno de la MEC varía la densidad de las fibras que forman el andamio modificando la porosidad y firmeza del material, influyendo sobre la viabilidad celular, reportándose que una concentración de 10 mg/ml de MEC para preparar el injerto resulta en andamios más poblados y con una mayor viabilidad celular que las concentraciones de 1 y 5 mg/ml (Gong et al., 2021). Para establecimiento de la concentración de MEC utilizada para la formación de los hidrogeles se buscó que el hidrogel resistiera las fuerzas de compresión. En este estudio concentraciones de 10 mg/ml resultaron en la preparación de hidrogeles que perdían la consistencia tras su manipulación, mientras que los hidrogeles de 20 mg/ml facilitaron su manejo, demostrando que los hidrogeles son biocompatibles en ensayos *in vitro*.

Un aumento en la cantidad de fibras de colágeno implicaría un incremento en el número de dominios proteicos para la interacción celular, desencadenando la señalización celular requerida para ejecutar mecanismos de sobrevivencia celular, como lo son el anclaje y la migración celular ("Chapter 7 - Cell Adhesion and the Extracellular Matrix," 2021). A pesar de que el colágeno es la principal proteína

presente entre las distintas MECs obtenidas de diversos tejidos, estas pueden diferir en el tipo de colágeno y de proteínas no colágenas que constituyen la MEC (Dziki et al., 2017). También se sabe que dependiendo del tejido de origen de donde se obtenga la MEC se puede afectar diferencialmente al comportamiento o la actividad celular, incidiendo en la actividad metabólica de los Mø. La MEC derivada de tejidos como el músculo esquelético, la dermis, el colon, el cerebro y la vejiga urinaria pueden disminuir el metabolismo del MTT de los Mø hasta en un 50%, mientras que los Mø expuestos a la MEC derivada de submucosa del intestino delgado, el esófago y el hígado mantienen una actividad metabólica similar al grupo control (Dziki et al., 2017).

En este estudio, los ensayos de viabilidad celular con MTT mostraron que los hidrogeles de MEC con o sin NPs Ag inducen en Mø, NIHT3T y AD-MSK una actividad metabólica muy por encima que el grupo control sin promover la lisis celular ni interferir en la proliferación celular. Además, el ensayo de vida y muerte permitieron determinar que no hay alteración de la integridad de la membrana en células NIHT3T, AD-MSK y Mø al ser expuestas a la MEC de vejiga porcina. Sin embargo, los Mø tratados con el grupo experimental MHV NPs Ag mostraron algunas células dañadas y muertas. Aún más, en este grupo se pudo observar que las células NIHT3T y AD-MSK no desplegaron la morfología celular típica. Por lo tanto, aunque MTT y LDH no detectaron efectos negativos sobre las células con los ensayo de vida y muerte fue posible determinar el efecto perjudicial de la incorporación de las NPs Ag a los hidrogeles. Contrario a estos resultados,

algunos informes muestran que los hidrogeles de colágeno tipo I con NPs Ag presentan buena biocompatibilidad en fibroblastos y osteoblastos (D'Souza et al., 2013).

Además, el estado metabólico incrementado de las células en respuesta a los hidrogeles de MEC podrían sugerir altas cantidades de NADH y NADPH para la reducción del MTT, vía principal por la cual se metaboliza esta sal (Berridge & Tan, 1993). Se sabe que aunque se lleva a cabo el proceso de descelularización de la MEC se puede encontrar la presencia de mitocondrias, organelo donde se lleva a cabo el proceso de metabolización del MTT relacionándose esto con una mayor obtención de cristales de formazan, a su vez estos organelos son capaces de promover la polarización de los Mø hacia un fenotipo M1 (Keane, Londono, Turner, & Badylak, 2012; Leifer & Badylak; Londono, Dziki, Haljasmaa, & Turner, 2017). Curiosamente, la respuesta inflamatoria a los biomateriales puede regular los niveles extracelulares del factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2) y promover la reparación de tejidos (Vasconcelos, Águas, Barbosa, Pelegrín, & Barbosa, 2019).

Por su parte, a través de citometría de flujo y el ensayo de CBAs se evidenció que los hidrogeles de MEC con o sin NPs Ag promueven la polarización del Mø hacia un fenotipo M1, de acuerdo con el perfil de expresión de citocinas proinflamatorias detectado. Contrario a nuestros resultados, algunos estudios muestran que los

hidrogeles elaborados a partir de MEC de vejiga urinaria porcina promueven la polarización del M $\phi$  hacia un fenotipo M2, con la expresión de marcadores de superficie de Fizz1 y CD206 con niveles bajos de iNOS (Dziki et al., 2017). Una de las características ideales de un andamio es que induzcan el reclutamiento celular y promuevan la degradación de la estructura de soporte para producir una propia. Esto requiere del reclutamiento y la activación del macrófago para poder fagocitar los componentes de la MEC. Se sabe que TNF es un potente activador de macrófagos y MCP1 está implicado en tráfico celular hacia los tejidos.

Además si no se elimina el contenido celular residual de la MEC xenogénica se puede inducir una reacción inmunológica, inflamación, encapsulación fibrótica y el proceso de cicatrización (Keane et al., 2012; Leifer & Badylak; Londono et al., 2017). Se sabe que el proceso de descelularización del tejido es un paso crucial para la obtención de andamios para la regeneración tisular sin que este desencadene un proceso de rechazo inmunológico. En nuestro grupo de investigación se había desarrollado una metodología, donde a través del uso de soluciones de EDTA, tripsina y detergentes se logró remover el contenido celular de la vejiga de cerdo [28]. En este estudio se empleó esta metodología sin el uso de detergentes obteniendo MEC descelularizada sin observarse núcleos intactos visibles. Se ha reportado que la presencia de detergentes residuales en las MEC puede desnaturalizar las fibras de colágeno y modificar los glicosaminoglucanos que contiene la membrana basal de la MEC, lo que afecta la morfología celular, la

confluencia, la expresión de la integrina  $\beta$ -1 y la capacidad de penetración de las células en el andamio (Faulk et al., 2014).

Durante el proceso de obtención de los hidrogeles se obtuvieron 3 presentaciones de la MEC, de las cuales 2 se emplearon en los ensayos de regeneración tisular. En este estudio, observamos que la unión celular y la infiltración se llevaron a cabo con éxito en los hidrogeles de MEC. Los ensayos de penetración celular indican que los hidrogeles con o sin NPs Ag son biocompatibles al permitir la adherencia y proliferación de las células y desplegar su morfología celular, mostrando que estos son biocompatibles permitiendo la colonización del andamio.

Para la biocompatibilidad *in vivo* se construyó un modelo de trasplante subcutáneo en ratas para identificar el tipo de infiltrado celular. La respuesta del hospedero a los hidrogeles de MEC como a los hidrogeles de MEC con NPs Ag promovió el reclutamiento de células, principalmente células inmunológicas mononucleares, y células con morfología fibroblastoide, con pequeños cúmulos de neutrófilos polimorfonucleares. Otro modelo subcutáneo en ratones muestra la migración de células hacia el hidrogel de MEC y angiogénesis 7 días después de la colocación del implante, corroborando la biocompatibilidad de estos materiales *in vivo* (Liang et al., 2020). Aunque en estudios de procesos de regeneración, el infiltrado de células mononucleares presente en el implante puede disminuir después de las 4

semanas (Badylak et al., 1995), y después de 8 semanas se puede observar una reducción del proceso inflamatorio (Muñoz-Ruíz et al., 2017).

Hasta el momento, de acuerdo a los artículos revisados para la obtención de un modelo de degradación ósea *in vivo*, los defectos óseos realizados en roedores se realizan mediante el método de ligación, el cual consiste en colocar ligas en la encía para provocar inflamación del tejido y degradación ósea. También esta reacción inflamatoria puede ser desencadenada por la inoculación de LPS o bacterias entre el ligamento periodontal y el hueso alveolar. En este estudio se empleó LPS de *E. coli* y *S. typhimurium* y bacterias de *E. feacalis* para provocar el defecto óseo. Sin embargo, a través de esta metodología no se logró producir un defecto óseo visible, lo cual para nuestros fines de colocar el andamio de MEC no nos resultó óptimo. De esta manera nuestro equipo de investigación decidió realizar un defecto mecánico y contaminar con bacterias viables la lesión justo después del procedimiento. Así mismo de los 3 componentes microbianos empleados solo las bacterias viables y no sus derivados lograron promover la degradación ósea. Así mismo, se logró observar que los hidrogeles de MEC permiten la regeneración del tejido incluso en condiciones de contaminación bacteriana.

Es importante que las NPs Ag permitan la proliferación celular y que al mismo tiempo tenga el efecto antibacteriano. Yijuan-Song y col. demostraron que las NPs

Ag presentan una mayor biocompatibilidad en fibroblastos que las NPs de óxido de zinc en un rango de concentraciones desde los 10 hasta los 200  $\mu\text{g/ml}$ . Además, se ha evidenciado que las NPs Ag no desencadenan procesos de estrés oxidativo sino que promueven la capacidad anti oxidativa de las células [23]. Entre los parámetros de mayor importancia que contribuyen a la actividad antibacteriana de las NPs Ag es el tamaño, donde dependiendo del tamaño de las NPs Ag difiere la actividad antibacteriana. Mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria se determinó que a medida que disminuye el tamaño de las NPS Ag se requiere de menos concentración para impedir el crecimiento de las bacterias, donde las NPS Ag con un tamaño de 8.4 nm se necesitaba de una concentración de solo 101  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que para las NPs Ag de un tamaño de 16.1 nm se necesitaban de 145  $\mu\text{g/ml}$  y para las NPs Ag de 98 nm de 320  $\mu\text{g/ml}$  [31]. En este estudio se obtuvieron NPs Ag con un promedio de 5.8 nm logrando inhibir el crecimiento bacteriano.

## XI. CONCLUSIONES

1. Se logró establecer un proceso de descelularización de la vejiga de cerdo sin el uso de detergentes demostrando ser un método alternativo que logra la remoción del contenido celular.
2. El hidrogel de MEC derivado de vejiga urinaria se comporta como un biomaterial dinámico que aumenta la proliferación celular e induce la producción de citocinas proinflamatorias.
3. La funcionalización de los hidrogeles de MEC de vejiga de cerdo con NPs Ag no inhibe los procesos esenciales para la sobrevivencia celular ni se presentan cambios significativos en los resultados en comparación con la MEC, sin embargo si afectan la morfología celular.
4. Los hidrogeles de MEC con o sin NPs Ag demostraron ser funcionales como andamios biológicos permitiendo la colonización de las AD-MSCs. *In vivo*, ambos hidrogeles permiten la colonización de células del huésped de tipo fibroblástico, células mononucleares y en menor medida células polimorfonucleares, sin observarse daño ni inflamación tisular.
5. La MEC presenta un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano en su estado líquido mientras que en su estado polimerizado no lo ejercen.
6. Los hidrogeles con NPs Ag inhibieron el crecimiento bacteriano en ambos estados.

7. La MEC por sí misma es capaz de regenerar el tejido en condiciones de contaminación bacteriana.
8. El hidrogel de MEC de vejiga de cerdo es un material biocompatible que permite el relleno de defectos óseos y que tiene el potencial de usarse en terapia regenerativa.
9. Por último, la funcionalización de los hidrogeles con NPs Ag no es recomendable, a pesar de su efecto antibacteriano.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Amalakara, J., Reddy, K., Avula, H., Mishra, A., Kalakonda, B., & Pandey, R. (2017). Evaluation of Cyclosporine A with beta-TCP in the Treatment of Human Infra bony Defects - A Randomized Controlled Pilot Study. *J Clin Diagn Res*, 11(1), Zc66-zc70. doi: 10.7860/jcdr/2017/23365.9194
- Arboleya, L., & Castañeda, S. (2013). Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *Reumatología Clínica*, 9(5), 303-315. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2013.02.008>
- Armitage, G. C. (2008). [Challenges in diagnosis and classification of periodontal diseases and conditions]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 43(5), 260-263.
- Badylak, S. F., Tullius, R., Kokini, K., Shelbourne, K. D., Klootwyk, T., Voytik, S. L., . . . Simmons, C. (1995). The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model. *J Biomed Mater Res*, 29(8), 977-985. doi: 10.1002/jbm.820290809
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474-482. doi: <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- . Chapter 7 - Cell Adhesion and the Extracellular Matrix. (2021). In S. R. Goodman (Ed.), *Goodman's Medical Cell Biology (Fourth Edition)* (pp. 203-247): Academic Press.
- Chen, C., Zhang, X., Lin, Q., Remlinger, N. T., Gilbert, T. W., & Di, Y. P. (2019). Urinary Bladder Matrix Protects Host in a Murine Model of Bacterial-Induced Lung Infection. *Tissue Eng Part A*, 25(3-4), 257-270. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0080
- D'Souza, R. S., Bhat, K. G., Sailaja, D., Babji, D. V., Bandiwadekar, T. K., & Katgalkar, R. M. (2013). Analysis of Expression and Localization of TLR-2 by Immunofluorescent Technique in Healthy and Inflamed Oral Tissues. *J Clin Diagn Res*, 7(12), 2780-2683. doi: 10.7860/jcdr/2013/6745.3745
- Dumitrescu, A. L., Abd-El-Aleem, S., Morales-Aza, B., & Donaldson, L. F. (2004). A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol*, 31(8), 596-603. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00528.x
- Dziki, J. L., Wang, D. S., Pineda, C., Sicari, B. M., Rausch, T., & Badylak, S. F. (2017). Solubilized extracellular matrix bioscaffolds derived from diverse source tissues differentially influence macrophage phenotype. *J Biomed Mater Res A*, 105(1), 138-147. doi: 10.1002/jbm.a.35894
- Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Slade, G. D., Thornton-Evans, G. O., Borgnakke, W. S., . . . Genco, R. J. (2015). Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*, 86(5), 611-622. doi: 10.1902/jop.2015.140520
- Espinosa-Cristóbal, L. F., Martínez-Castañón, G. A., Martínez-Martínez, R. E., Loyola-Rodríguez, J. P., Patiño-Marín, N., Reyes-Macías, J. F., & Ruiz, F. (2009). Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Materials Letters*, 63(29), 2603-2606. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.09.018>
- Faulk, D. M., Carruthers, C. A., Warner, H. J., Kramer, C. R., Reing, J. E., Zhang, L., . . . Badylak, S. F. (2014). The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater*, 10(1), 183-193. doi: 10.1016/j.actbio.2013.09.006

- Ferreira, M. C., Dias-Pereira, A. C., Branco-de-Almeida, L. S., Martins, C. C., & Paiva, S. M. (2017). Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. *J Periodontal Res*. doi: 10.1111/jre.12436
- Garcia-Astrain, C., Chen, C., Buron, M., Palomares, T., Eceiza, A., Fruk, L., . . . Gabilondo, N. (2015). Biocompatible hydrogel nanocomposite with covalently embedded silver nanoparticles. *Biomacromolecules*, *16*(4), 1301-1310. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00101
- Giraldo-Gomez, D. M., Leon-Mancilla, B., Del Prado-Audelo, M. L., Sotres-Vega, A., Villalba-Caloca, J., Garciadiego-Cazares, D., & Piña-Barba, M. C. (2016). Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, *59*, 930-937. doi: 10.1016/j.msec.2015.10.094
- Gong, D., Yu, F., Zhou, M., Dong, W., Yan, D., Zhang, S., . . . Lu, Y. (2021). Ex Vivo and In Vivo Properties of an Injectable Hydrogel Derived From Acellular Ear Cartilage Extracellular Matrix. *Front Bioeng Biotechnol*, *9*, 740635. doi: 10.3389/fbioe.2021.740635
- Hajishengallis, G. (2014). Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and the host response. *Trends Immunol*, *35*(1), 3-11. doi: 10.1016/j.it.2013.09.001
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, *15*(1), 30-44. doi: 10.1038/nri3785
- Halper, J. (2021). Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Elastin, Fibrillins, Fibulins, Matrilins, Tenascins and Thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*, *1348*, 105-126. doi: 10.1007/978-3-030-80614-9\_4
- Irokawa, D., Takeuchi, T., Noda, K., Goto, H., Egawa, M., Tomita, S., . . . Saito, A. (2017). Clinical outcome of periodontal regenerative therapy using collagen membrane and deproteinized bovine bone mineral: a 2.5-year follow-up study. *BMC Research Notes*, *10*, 102. doi: 10.1186/s13104-017-2426-y
- Jalaluddin, M., Singh, D. K., Jayanti, I., Kulkarni, P., Faizuddin, M., & Tarannum, F. (2017). Use of Platelet Rich Plasma in the Management of Periodontal Intra-Osseous Defects: A Clinical Study. *J Int Soc Prev Community Dent*, *7*(2), 105-115. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD\_28\_17
- Jayaprakash, N., Judith Vijaya, J., John Kennedy, L., Priadharsini, K., & Palani, P. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from serine. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, *49*, 316-322. doi: 10.1016/j.msec.2015.01.012
- Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B., & Aflatoonian, R. (2012). Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp*(69). doi: 10.3791/4372
- Keane, T. J., Londono, R., Turner, N. J., & Badylak, S. F. (2012). Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, *33*(6), 1771-1781. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.054
- Kim, Y. K., Kim, S. G., Lim, S. C., Lee, H. J., & Yun, P. Y. (2010). A clinical study on bone formation using a demineralized bone matrix and resorbable membrane. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *109*(6), e6-11. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.01.012
- Kurtulus Waschulewski, I., Gokbuget, A. Y., Christiansen, N. M., Ziegler, M., Schuster, V., Wahl, G., & Gotz, W. (2016). Immunohistochemical analysis of the gingiva with periodontitis of type I plasminogen deficiency compared to gingiva with gingivitis and periodontitis and healthy gingiva. *Arch Oral Biol*, *72*, 75-86. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.07.013
- Leifer, C. A., & Badylak, S. F. The effect of cell debris within biologic scaffolds upon the macrophage response. *J Biomed Mater Res A*. doi: 10.1002/jbm.a.36055
- Liang, J., Yi, P., Wang, X., Huang, F., Luan, X., Zhao, Z., & Liu, C. (2020). Acellular matrix hydrogel for repair of the temporomandibular joint disc. *108*(7), 2995-3007. doi: 10.1002/jbm.b.34629

- Loe, H., & Brown, L. J. (1991). Early onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol*, *62*(10), 608-616. doi: 10.1902/jop.1991.62.10.608
- Loesche, W. (2007). Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications. *Infect Dis Clin North Am*, *21*(2), 471-502, vii. doi: 10.1016/j.idc.2007.03.006
- Londono, R., Dziki, J. L., Haljasmaa, E., & Turner, N. J. (2017). The effect of cell debris within biologic scaffolds upon the macrophage response. *105*(8), 2109-2118. doi: 10.1002/jbm.a.36055
- Machtei, E. E., Christersson, L. A., Grossi, S. G., Dunford, R., Zambon, J. J., & Genco, R. J. (1992). Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". *J Periodontol*, *63*(3), 206-214. doi: 10.1902/jop.1992.63.3.206
- Muñoz-Ruiz, A., Silva-Benítez, E., Soto-Sainz, E., Cerda-Cristerna, B., Ortiz-Magdaleno, M., Pozos-Guillen, A., & Flores, H. (2017). Evaluation of Decellularized Matrix and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate as Biomaterials for Bone Neof ormation. In vivo Study. *International Journal of Morphology*, *35*(3).
- Naqvi, A. Z., Mu, L., Hasturk, H., Van Dyke, T. E., Mukamal, K. J., & Goodson, J. M. (2017). The Impact of Docosahexaenoic Acid Therapy on Subgingival Plaque Microbiota. *J Periodontol*, 1-13. doi: 10.1902/jop.2017.160398
- Pouliot, R. A., Young, B. M., Link, P. A., Park, H. E., Kahn, A. R., Shankar, K., . . . Heise, R. L. (2020). Porcine Lung-Derived Extracellular Matrix Hydrogel Properties Are Dependent on Pepsin Digestion Time. *Tissue Eng Part C Methods*, *26*(6), 332-346. doi: 10.1089/ten.TEC.2020.0042
- Queiroz, L. A., Casarin, R. C., Dabdoub, S. M., Tatakis, D. N., Sallum, E. A., & Kumar, P. S. (2017). Furcation Therapy With Enamel Matrix Derivative: Effects on the Subgingival Microbiome. *J Periodontol*, 1-11. doi: 10.1902/jop.2017.160542
- Sawkins, M. J., Bowen, W., Dhadda, P., Markides, H., Sidney, L. E., Taylor, A. J., . . . White, L. J. (2013). Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta Biomater*, *9*(8), 7865-7873. doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.029
- Sculean, A., Nikolidakis, D., Nikou, G., Ivanovic, A., Chapple, I. L., & Stavropoulos, A. (2015). Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontol 2000*, *68*(1), 182-216. doi: 10.1111/prd.12086
- Silva-Benitez, E., Soto-Sainz, E., Pozos-Guillen, A., Romero-Quintana, J. G., Aguilar-Medina, M., Ayala-Ham, A., . . . Flores, H. (2015). Quantification of DNA in urinary porcine bladder matrix using the ACTB gene. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *51*(10), 1040-1046. doi: 10.1007/s11626-015-9927-6
- Song, Y., Guan, R., Lyu, F., Kang, T., Wu, Y., & Chen, X. (2014). In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutat Res*, *769*, 113-118. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.08.001
- Soto-Sainz, E., Silva Benítez, E., Romero-Quintana, J., Pozos-Guillen, A., Aguilar-Medina, M., Ayala-Ham, A. R., . . . Ramos-Payan, R. (2016). Synthesis and biofunctionalization of extracellular matrix hidrogel for bone regeneration. *Dental Materials*, *32*, Supplement 1, e31. doi: 10.1016/j.dental.2016.08.063
- Thomas, V., Yallapu, M. M., Sreedhar, B., & Bajpai, S. K. (2007). A versatile strategy to fabricate hydrogel-silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity. *J Colloid Interface Sci*, *315*(1), 389-395. doi: 10.1016/j.jcis.2007.06.068
- Vasconcelos, D. P., Águas, A. P., Barbosa, M. A., Pelegrín, P., & Barbosa, J. N. (2019). The inflammasome in host response to biomaterials: Bridging inflammation and tissue regeneration. *Acta Biomater*, *83*, 1-12. doi: 10.1016/j.actbio.2018.09.056

Worch, K. P., Listgarten, M. A., & Korostoff, J. M. (2001). A multidisciplinary approach to the diagnosis and treatment of early-onset periodontitis: a case report. *J Periodontol*, 72(1), 96-106. doi: 10.1902/jop.2001.72.1.96

## **XIII. ANEXOS**

### **Anexo 1 Procedimiento ensayo de MTT**

1. Los osteoblastos obtenidos se desprenderán de la caja de cultivo agregando 500 µl de tripsina-EDTA 0.25% e incubando 5 minutos a 37 °C.
2. Se colocará la suspensión celular en un tubo falcon de 15 ml y se centrifugará a 1500 rpm durante 5 minutos.
3. Se decantará el sobrenadante y el pellet celular se resuspenderá en 1 ml de medio de cultivo para determinar la concentración y viabilidad celular en cámara de Neubauer mediante la tinción con azul de tripano.
4. Se sembrarán en una caja de 96 pozos 2,000 células en 200 µl de medio condicionado y se incubarán a 37 °C.
5. Terminada la incubación se retirará 100 µl de medio de cultivo y se añadirán 15 µl de solución de tinción.
6. Se incubará durante 4 horas a 37°C, se añadirán 100 µl de solución de paro y se incubará a 4 °C durante 1 hora.
7. Por último, se realizará la lectura en un lector de placas a 570 nm.

### **Anexo 2. Procedimiento del ensayo de vida y muerte**

1. Se preparará una caja de cultivo de 24 pozos depositando cubreobjetos redondos (12 mm), previamente sanitizados con alcohol al 70 y esterilizados 15 minutos en luz UV, y agregando 1 ml de medio de cultivo estándar (DMEM, 10% suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico).
2. Luego se colocarán  $10 \times 10^4$  células por pozo y se incubarán a 37 ° en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad.
3. Tras 24 horas se remplazará el medio de cultivo por 1 ml de medio condicionado de cada uno de los grupos a evaluar.
4. Tras 24 horas del estímulo se realizará la tinción con yoduro de propídio a una concentración de 4.3 µM y 84 nM para naranja de tiazol.

5. 4  $\mu$ L de naranja de tiazol y 2  $\mu$ L de ioduro de propídio se agregaron dentro del pozo de cultivo y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Posteriormente, se procede a remoción del cubre objetos de la placa de cultivo y se coloca en las laminillas con 5  $\mu$ l de glicerol.
7. Observar las células teñidas en microscopio confocal.
8. Para el ioduro de propidio se empleará una longitud de onda de excitación de 536 nm y se recolectará la emisión a una la longitud de onda de 617 nm.
9. Para el naranja de tiazol se empleará una longitud de onda de excitación de 510 nm y se recolectará la emisión a una la longitud de onda de 530 nm.
10. Las células que se encuentren vivas emitirán fluorescencia color verde mientras que las células muertas se observarán de color rojo.

### **Anexo 3 Procedimiento ensayo de LDH**

1. Los osteoblastos obtenidos se desprenderán de la caja de cultivo agregando 500  $\mu$ l de tripsina-EDTA 0.25% e incubando 5 minutos a 37 °C.
2. Se colocará la suspensión celular en un tubo falcon de 15 ml y se centrifugará a 1500 rpm durante 5 minutos.
3. Se decantará el sobrenadante y el pellet celular se resuspenderá en 1 ml de medio de cultivo para determinar la concentración y viabilidad celular en cámara de Neubauer mediante la tinción con azul de tripano.
4. Se sembrarán en una caja de 96 pozos 2,000 células en 200  $\mu$ l de medio de cultivo condicionado y se incubarán 2 horas a 37 °C Después de la incubación se agregarán las diversas concentraciones de los materiales a evaluar y se incubarán horas a 37 °C.
5. Terminada la incubación se retirará el medio de cultivo y se lavará con PBS 1x, se transferirán 50  $\mu$ l de los sobrenadantes a un pozo nuevo y 50  $\mu$ l del mix de substrato LDH-solución de tinción-cofactor y se incubará a temperatura ambiente durante 30 minutos protegida de la luz en aluminio
6. La reacción se detendrá con 10  $\mu$ l de HCl 1 N.

7. Por último, se realizará la lectura en un lector de placas a 490 nm.

#### **Anexo 4. Procedimiento cortes histológicos en criostato**

1. La muestra se colocará en un molde de aluminio y se incluirá hasta cubrir la muestra por completo en polifreez.
2. Luego el molde se pondrá en contacto con nitrógeno líquido hasta congelar la muestra.
3. Enseguida la muestra se sacará del molde y se colocará sobre el porta espécimen y se ajustarán los cortes a 20  $\mu\text{m}$  de grosor.
4. Los cortes obtenidos serán cargados en los porta objetos suavemente y se dejará secar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Posteriormente la muestra sumergirá en acetona a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos para su fijación y se dejará secar 30 minutos a temperatura ambiente para proceder a realizar la tinción.

#### **Anexo 5. Procedimiento tinción hematoxilina & eosina**

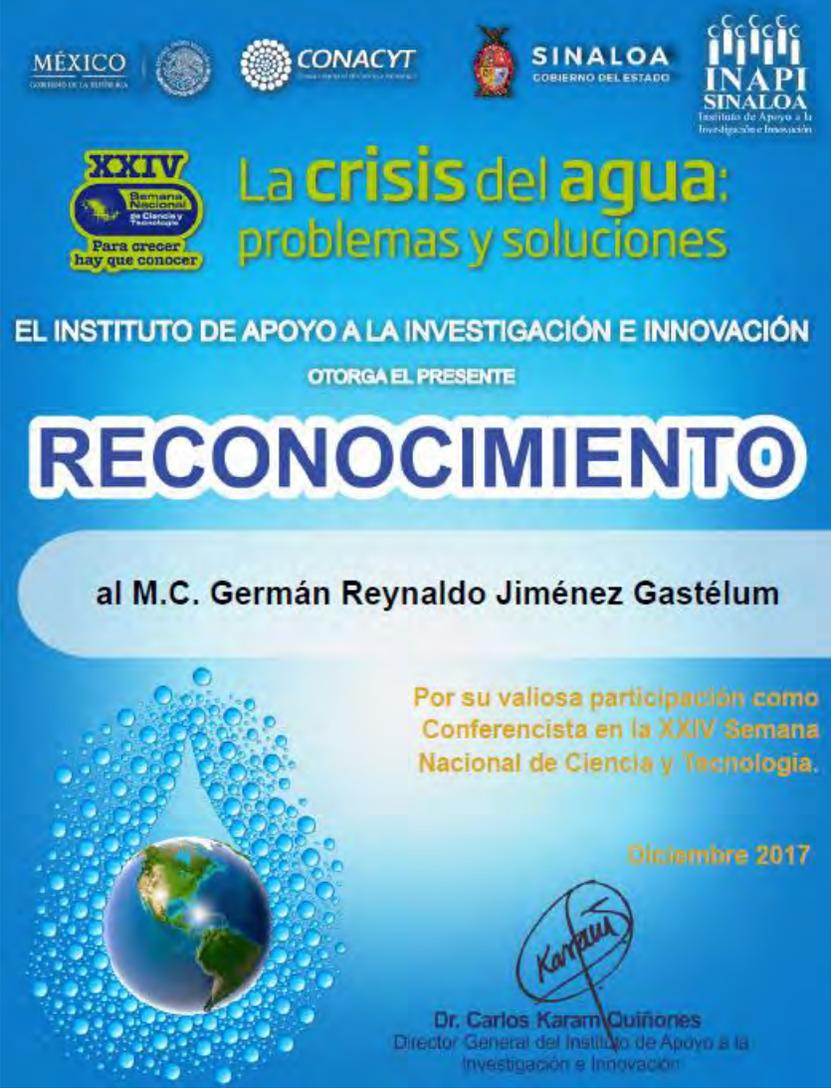
1. Se cubrirá la totalidad del tejido con hematoxilina de harris durante 1 minuto y se lavará con suficiente agua destilada.
2. Luego se sumergirá en alcohol ácido durante 15 segundos y se lavará con suficiente agua destilada.
3. Enseguida se sumergirá en solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 0,01% durante 15 segundos y se lavará con suficiente agua destilada.
4. Posteriormente se sumergirá en eosina durante 15 segundos y se deshidratará en alcohol al 70% durante 15 segundos y luego en alcohol al absoluto 2 veces durante 15 segundos.
5. Por último se pasará a xileno durante 1 minuto, se dejará secar y se montará en Entellan new.

## Anexo 6. Productos de la investigación

Presentación de Trabajo en la XXIV Semana Nacional de la Ciencia y Tecnología 2017



Presentación de Trabajo en la XXIV Semana Nacional de la Ciencia y Tecnología 2017



MÉXICO GOBIERNO DE LA FEDERACIÓN

CONACYT

SINALOA GOBIERNO DEL ESTADO

INAPI SINALOA Instituto de Apoyo a la Investigación e Innovación

XXIV Semana Nacional de Ciencia y Tecnología Para crecer hay que conocer

# La crisis del agua: problemas y soluciones

EL INSTITUTO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN OTORGA EL PRESENTE

## RECONOCIMIENTO

al M.C. Germán Reynaldo Jiménez Gastélum

Por su valiosa participación como Conferencista en la XXIV Semana Nacional de Ciencia y Tecnología.

Diciembre 2017

*Karam*

Dr. Carlos Karam Quiñones  
Director General del Instituto de Apoyo a la Investigación e Innovación

The certificate features a blue background with a central graphic of a globe surrounded by water droplets. Logos for Mexico, CONACYT, Sinaloa, and INAPI are at the top. The title 'La crisis del agua: problemas y soluciones' is in large yellow font. The recipient's name is in a white rounded rectangle. The date 'Diciembre 2017' is in orange. A signature and the name of the director are at the bottom right.

Presentación de Trabajo en el IV Encuentro Interposgrados y I Reunión de Investigación en Odontología 2018



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
A través de  
**Facultad de Odontología**

Otorga la presente: **RECONOCIMIENTO**

A: *Jiménez-Gastélum Germán Reynaldo, Aguilar-Medina Elsa Maribel, Ayala-Ham Alfredo del Rosario, Romero-Quintana José Geovanni, Soto-Sainz Jesús Eduardo, Espinoza-Frishtal León Francisco, Ramos-Payan Rosalís, Vebra-Berlitz Erika de Lourdes.*

Por su participación en el IV Encuentro Interposgrados y I Reunión de Investigación en Odontología con el CARTEL titulado “EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE UN ANDAMIO DE MATRIZ EXTRACELULAR BIOFUNCIONALIZADO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA”, celebrado el día 23 de Junio de 2018, en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México.

  
Dra. Anabell Cárdenas Valdez  
Directora

  
Dr. Jesús Eduardo Soto Sainz  
Coordinador de Investigación

  
Dr. Guadalupe Javier Sánchez Cuevas  
Secretario Académico



**1 Crédito**

Presentación de Trabajo en el Sexto Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Sinaloa 2018

**EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA**

OTORGA EL PRESENTE

# RECONOCIMIENTO

**A:** Germán Reynaldo Jiménez Gastélum, Elsa Maribel Aguilar Medina, Alfredo Del Rosario Ayala Ham, José Geovanni Romero Quintana, José Eduardo Soto Sainz, León Francisco Espinoza Cristóbal, Rosalío Ramos Payan, Gloria Yolanda Castro Salazar, Erika De Lourdes Silva Benítez

Por su participación en el trabajo: **EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD CELULAR DE UN ANDAMIO DE MATRIZ EXTRACELULAR BIOFUNCIONALIZADO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA** en modalidad: Ponencia dentro del marco del Sexto Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Sinaloa, celebrado los días 12 y 13 de septiembre de 2018 en la ciudad y puerto de Mazatlán, Sinaloa, México.

MTRA. *[Signature]* **DIANA EISELA MORALES GONZÁLEZ**  
DIRECTORA DE VINCULACIÓN  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DR. *[Signature]* **ALFREDO ROMÁN MESSINA**  
RECTOR  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA

**Logos at the bottom:** CONACYT, UTP, SINALOA, INAPI SINALOA, MÉXICO, and various university logos including UAM, UNAM, UNED, UNIC, UNL, UNO, UNP, UNQ, UNR, UNV, UNW, UNX, UNY, UNZ, UNAA, UNAB, UNAC, UNAD, UNAE, UNAF, UNAG, UNAH, UNAJ, UNAK, UNAL, UNAM, UNAN, UNAO, UNAP, UNAQ, UNAR, UNAS, UNAT, UNAU, UNAV, UNAW, UNAX, UNAY, UNAZ, UNBA, UNBB, UNBC, UNBD, UNBE, UNBF, UNBG, UNBH, UNBI, UNBJ, UNBK, UNBL, UNBM, UNBN, UNBO, UNBP, UNBQ, UNBR, UNBS, UNBT, UNBU, UNBV, UNBW, UNBX, UNBY, UNBZ, UNCA, UNCB, UNCC, UNCD, UNCE, UNCF, UNCG, UNCH, UNCI, UNCL, UNCM, UNCN, UNCO, UNCP, UNCQ, UNCR, UNCS, UNCT, UNCU, UNCV, UNCW, UNCX, UNCY, UNCZ, UNDA, UNDB, UNDC, UNDD, UNDE, UNDF, UNDG, UNDH, UNDI, UNDL, UNDM, UNDN, UNDO, UNDP, UNDQ, UNDR, UNDS, UNDT, UNDU, UNDV, UNDW, UNDX, UNDY, UNDZ, UNEA, UNEB, UNEC, UNED, UNEE, UNEF, UNEG, UNEH, UNEI, UNEL, UNEM, UNEN, UNEO, UNEP, UNEQ, UNER, UNES, UNET, UNEU, UNEV, UNEW, UNEX, UNFY, UNFZ, UNGA, UNGB, UNGC, UNGD, UNGE, UNGF, UNGG, UNGH, UNGI, UNGJ, UNGK, UNGL, UNGM, UNGN, UNGO, UNGP, UNGQ, UNGR, UNGS, UNGT, UNGU, UNGV, UNGW, UNGX, UNGY, UNGZ, UNHA, UNHB, UNHC, UNHD, UNHE, UNHF, UNHG, UNHI, UNHJ, UNHK, UNHL, UNHM, UNHN, UNHO, UNHP, UNHQ, UNHR, UNHS, UNHT, UNHU, UNHV, UNHW, UNHX, UNHY, UNHZ, UNIA, UNIB, UNIC, UNID, UNIE, UNIF, UNIG, UNIH, UNIJ, UNIK, UNIL, UNIM, UNIN, UNIO, UNIP, UNIQ, UNIR, UNIS, UNIT, UNIU, UNIV, UNIW, UNIX, UNJG, UNJH, UNJI, UNJK, UNJL, UNJM, UNJN, UNJO, UNJP, UNJQ, UNJR, UNJS, UNJT, UNJU, UNJV, UNJW, UNJX, UNJY, UNJZ, UNKA, UNKB, UNKC, UNKD, UNKE, UNKF, UNKG, UNKH, UNKI, UNKJ, UNKK, UNKL, UNKM, UNKN, UNKO, UNKP, UNKQ, UNKR, UNKS, UNKT, UNKU, UNKV, UNKW, UNKX, UNKY, UNKZ, UNLA, UNLB, UNLC, UNLD, UNLE, UNLF, UNLG, UNLH, UNLI, UNLJ, UNLK, UNLL, UNLM, UNLN, UNLO, UNLP, UNLQ, UNLR, UNLS, UNLT, UNLU, UNLV, UNLW, UNLX, UNLY, UNLZ, UNMA, UNMB, UNMC, UNMD, UNME, UNMF, UNMG, UNMH, UNMI, UNMJ, UNMK, UNML, UNMN, UNMO, UNMP, UNMQ, UNMR, UNMS, UNMT, UNMU, UNMV, UNMW, UNMX, UNMY, UNMZ, UNNA, UNNB, UNNC, UNND, UNNE, UNNF, UNNG, UNNH, UNNI, UNNJ, UNNK, UNNL, UNNM, UNNN, UNNO, UNNP, UNNQ, UNNR, UNNS, UNNT, UNNU, UNNV, UNNW, UNNX, UNNY, UNNZ, UNOA, UNOB, UNOC, UNOD, UNOE, UNOF, UNOG, UNOH, UNOI, UNOJ, UNOK, UNOL, UNOM, UNON, UNOO, UNOP, UNOQ, UNOR, UNOS, UNOT, UNOU, UNOV, UNOW, UNOX, UNOY, UNOZ, UNPA, UNPB, UNPC, UNPD, UNPE, UNPF, UNPG, UNPH, UNPI, UNPJ, UNPK, UNPL, UNPN, UNPO, UNPP, UNPQ, UNPR, UNPS, UNPT, UNPU, UNPV, UNPW, UNPX, UNPY, UNPZ, UNQA, UNQB, UNQC, UNQD, UNQE, UNQF, UNQG, UNQH, UNQI, UNQJ, UNQK, UNQL, UNQM, UNQN, UNQO, UNQP, UNQQ, UNQR, UNQS, UNQT, UNQU, UNQV, UNQW, UNQX, UNQY, UNQZ, UNRA, UNRB, UNRC, UNRD, UNRE, UNRF, UNRG, UNRH, UNRI, UNRJ, UNRK, UNRL, UNRM, UNRN, UNRO, UNRP, UNRQ, UNRR, UNRS, UNRT, UNRU, UNRV, UNRW, UNRX, UNRY, UNRZ, UNSA, UNSB, UNSC, UNSD, UNSE, UNSF, UNSG, UNSH, UNSI, UNSJ, UNSK, UNSL, UNSM, UNSN, UNSO, UNSP, UNSQ, UNSR, UNSS, UNST, UNSU, UNSV, UNSW, UNSX, UNSY, UNSZ, UNTA, UNTB, UNTC, UNTD, UNTE, UNTF, UNTG, UNTH, UNTI, UNTJ, UNTK, UNTL, UNTM, UNTN, UNTO, UNTP, UNTQ, UNTR, UNTS, UNTT, UNTU, UNTV, UNTW, UNTX, UNTY, UNTZ, UNUA, UNUB, UNUC, UNUD, UNUE, UNUF, UNUG, UNUH, UNUI, UNUJ, UNUK, UNUL, UNUM, UNUN, UNUO, UNUP, UNUQ, UNUR, UNUS, UNUT, UNUU, UNUV, UNUW, UNUX, UNUY, UNUZ, UNVA, UNVB, UNVC, UNVD, UNVE, UNVF, UNVG, UNVH, UNVI, UNVJ, UNVK, UNVL, UNVM, UNVN, UNVO, UNVP, UNVQ, UNVR, UNVS, UNVT, UNVU, UNVV, UNVW, UNVX, UNVY, UNVZ, UNWA, UNWB, UNWC, UNWD, UNWE, UNWF, UNWG, UNWH, UNWI, UNWJ, UNWK, UNWL, UNWM, UNWN, UNWO, UNWP, UNWQ, UNWR, UNWS, UNWT, UNWU, UNWV, UNWW, UNWX, UNWY, UNWZ, UNXA, UNXB, UNXC, UNXD, UNXE, UNXF, UNXG, UNXH, UNXI, UNXJ, UNXK, UNXL, UNXM, UNXN, UNXO, UNXP, UNXQ, UNXR, UNXS, UNXT, UNXU, UNXV, UNXW, UNXX, UNXY, UNXZ, UNYA, UNYB, UNYC, UNYD, UNYE, UNYF, UNYG, UNYH, UNYI, UNYJ, UNYK, UNYL, UNYM, UNYN, UNYO, UNYP, UNYQ, UNYR, UNYS, UNYT, UNYU, UNYV, UNYW, UNYX, UNYY, UNYZ, UNZA, UNZB, UNZC, UNZD, UNZE, UNZF, UNZG, UNZH, UNZI, UNZJ, UNZK, UNZL, UNZM, UNZN, UNZO, UNZP, UNZQ, UNZR, UNZS, UNZT, UNZU, UNZV, UNZW, UNZX, UNZY, UNZZ.

Presentación de Trabajo en el V Encuentro Interposgrados y II Reunión de Investigación en Odontología



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
A través de  
Facultad de Odontología



Otorga el presente:

# RECONOCIMIENTO

*Jiménez-Gastélum Germán Reynaldo, E. M. Aguilar-Medina, A. R. Ayala-Cam, J. G.  
A: Romero-Quintana, J. E. Soto-Sainz, L. F. Espinoza-Frisóbal, R. Ramos-Layan,  
G. F. Castro-Balazar, E. L. Cibra-Benítez.*



Por su participación en el V Encuentro Interposgrados y II Reunión de Investigación en Odontología con el CARTEL titulado "EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN UN ANDAMIO DE MATRIZ EXTRACELULAR", celebrado el día 14 de Diciembre de 2018, en la ciudad de Culiacán, Sinaloa. México.



*Dra. Anabel Cárdenas Valdez*  
Directora

*Dr. Jesús Eduardo Soto Sainz*  
Coordinador de Investigación

*Dr. Guadalupe Javier Sánchez Cuevas*  
Secretario Académico

1 Crédito



ANIVERSARIO

# SEMANA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**DESASTRES NATURALES:**  
TERREMOTOS Y HURACANES

EL INSTITUTO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN  
OTORGA EL PRESENTE

# RECONOCIMIENTO

a: M.C. GERMÁN REYNALDO JIMÉNEZ GASTÉLUM

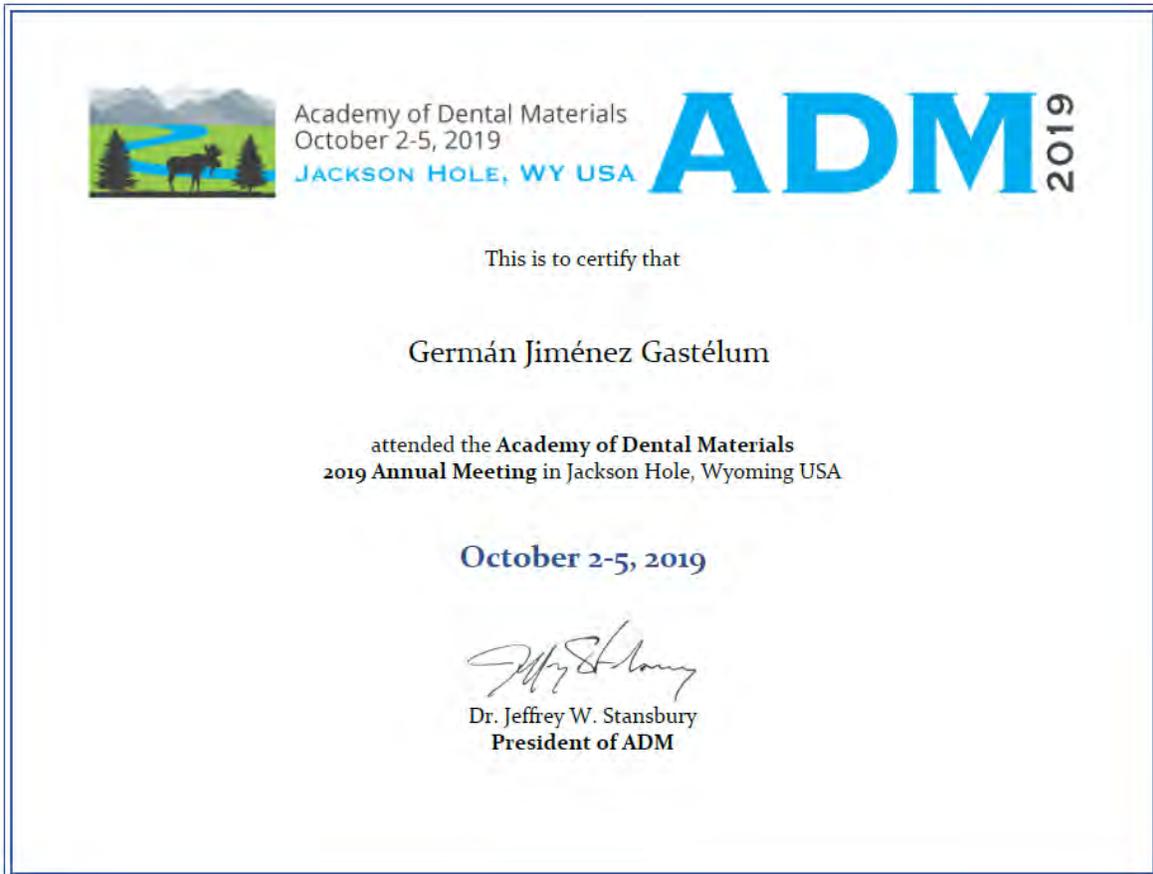
por su valiosa participación en la XXV Semana Nacional  
de Ciencia y Tecnología.



Octubre, 2018.

Ing. Bernardino Antelo Esper  
Director General  
Instituto de Apoyo a la Investigación e Innovación

Presentación de Trabajo en el Academy of Dental Materials 2019





## Dental Materials

Volume 35, Supplement 1, 2019, Pages e18-e19



36

# In vitro biocompatibility of extracellular matrix scaffolds with stem cells

GR Jiménez Gastélum<sup>1</sup>✉, AR Ayala-Ham<sup>1</sup>, JA López-Gutierrez<sup>1</sup>, R Ramos-Payan<sup>1</sup>, GY Castro-Salazar<sup>1</sup>, JG Romero-Quintana<sup>1</sup>, JE Soto-Sainz<sup>1</sup>, EM Aguilar-Medina<sup>1</sup>, LF Espinoza-Cristobal<sup>2</sup>, EL Silva-Benitez<sup>1</sup>

✉ Show more

<https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.08.037>

Get rights and content

Hindawi  
BioMed Research International  
Volume 2019, Article ID 9641456, 7 pages  
<https://doi.org/10.1155/2019/9641456>

*Review Article*

## **Antimicrobial Properties of Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering**

**Germán R. Jiménez-Gastélum,<sup>1,2</sup> Elsa M. Aguilar-Medina ,<sup>2</sup> Eduardo Soto-Sainz,<sup>3</sup> Rosalio Ramos-Payán ,<sup>2</sup> and Erika L. Silva-Benítez **<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Biology, Autonomous University of Sinaloa, Culiacan, Sinaloa 80010, Mexico*

<sup>2</sup>*Faculty of Biological and Chemical Sciences, Autonomous University of Sinaloa, Culiacan, Sinaloa 80010, Mexico*

<sup>3</sup>*Faculty of Odontology, Autonomous University of Sinaloa, Culiacan, Sinaloa 80010, Mexico*

Correspondence should be addressed to Erika L. Silva-Benítez; [erikasilva@uas.edu.mx](mailto:erikasilva@uas.edu.mx)

Received 30 May 2019; Revised 13 September 2019; Accepted 8 October 2019; Published 13 December 2019

Guest Editor: Jorge Padrão

Copyright © 2019 Germán R. Jiménez-Gastélum et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA UNIDAD ACADÉMICA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



OTORGA LA PRESENTE

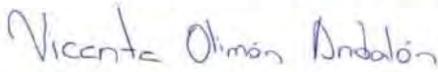
## Constancia

**A: M.C. German Reynaldo Jiménez Gastélum, Dra. Erika de Lourdes Silva-Benitez, M.C. Alfredo del Rosario Ayala Ham, Dr. Rosalio Ramos Payan, Yolanda Castro Salazar, Mercedes Bermúdez, Dr. Geovanni Romero Quintana, Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina.**

Por su participación como **Ponente Modalidad Oral** en el marco de la Jornada Sinaloense del Conocimiento 2019 "Bienestar y valores éticos para un cambio social" realizada del 07 al 30 del año en curso en las instalaciones de la Facultad de Biología, con el tema:

**"Biocompatibilidad *in vitro* de un hidrogel de matriz extracelular de vejiga porcina"**

ATENTAMENTE.-  
"Vida Ciencia y Conciencia"  
Culiacán Rosales, Sinaloa; octubre de 2019

  
DR. VICENTE OLIMÓN ANDALÓN  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

  
M.C. JUANA CAZAREZ MARTÍNEZ  
COORDINADORA ACADÉMICA





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



**PROTOCOLO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS  
TRONCALES MESENQUIMALES DE PULPA DE DIENTES  
DECIDUOS A OSTEÓBLASTOS**

Tesis como requisito para obtener el grado de  
Especialista en Odontopediatría

Presenta:

**C.D. Ana Lucía López Salazar**

Director de Tesis

**Dra. Erika De Lourdes Silva Benítez**

**M.C. Germán Reynaldo Jiménez Gastélum**

Asesor externo

**M.C. Jorge Armando López Gutiérrez**

Culiacán de Rosales, Sinaloa. 18 de enero del 2020

Asesor del Proyecto de Tesis de la Especialidad de Endodoncia 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



MODELO DE ENFERMEDAD PERIODONTAL EN RATAS WISTAR

TESIS QUE PRESENTA  
CD. ELIZABETH CARMONA BERNAL

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

DIRECTORES DE TESIS

DRA. ERIKA DE LOURDES SILVA BENÍTEZ  
DRA. EL SA MARIBEL AGUILAR MEDINA

ASESOR EXTERNO  
M.C. GERMAN REYNALDO JIMÉNEZ GASTELUM

CULIACÁN ROSALES, SINALOA, DICIEMBRE 2019

