

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA DIVISIÓN DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD POSGRADO EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL



Proyecto: “Ingeniería Tisular para la Formación de Hueso Autólogo Útil
en Autotrasplante”

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Biología Experimental

PRESENTA

Juan Carlos Jacinto Tinajero

COMITÉ TUTORAL

Dr. Rogelio Hernández Pando. Sección de Patología Experimental,
Departamento de Patología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán.

(Director)

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz. Laboratorio de Fisiología Celular,
Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS UAM-I **(Directora)**

Dr. Patricio Santillán Doherty. Dirección Médica. Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias.

(Asesor)

SEPTIEMBRE 2015.

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT.2003IDPTNNN0020.

Registro beca CONACYT 278480 CVU 224973

JURADO**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz****Presidente**

Laboratorio de Fisiología Celular. Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Iztapalapa

Dra. Avelina Sótres Vega**Secretaria**

Departamento de Cirugía Experimental
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Dr. Juan José Plata Muñoz**Vocal**

Escuela Nacional de Medicina
Laboratorio de Preservación de Tejidos y Terapia Celular.
Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Ciudad de
México

Dr. Armando Luna López**Vocal**

Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Geriatría

COMITÉ TUTORAL

Dr. Rogelio Hernández Pando **Director**

Laboratorio de Patología Experimental
Departamento de Patología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz **Directora**

Laboratorio de Fisiología Celular Departamento de
Ciencias de la Salud División de Ciencias Biológicas y
de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Dr. Patricio Santillán Doherty **Asesor**

Dirección Médica
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Conchita y al Dr. Hernández por todo el cariño y apoyo durante el viaje, no hay palabras. Indudablemente el vivir es aprender; me siento afortunado de haber tenido tutores ejemplares que me han heredado el conocimiento de la formación de investigadores y los compromisos con esta fascinante área de la ciencia: LA INVESTIGACIÓN.

PAT: Por ahí dicen que “nadie sabe lo que tiene hasta que lo pierde”.....más bien “nadie sabe lo que aprendió hasta que esta solo”.....que puedo decir, gracias por tu amistad, cariño, regaños, enseñanzas. Yo también, como tú a Orozco, lo único que te reclamo es que: ¡la pusiste muy alta!

Mi más profundo agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo al proyecto 2006-CO1-45386 así como la beca obtenida la duración del posgrado.

Resumen

El trauma, la osteomielitis, las resecciones de tumores óseos y el tratamiento de las deformidades congénitas son las principales causas de deficiencia de hueso. En los escenarios clínicos referidos los injertos autólogos son el tratamiento de elección. No obstante, los sitios anatómicos para obtener injertos óseos son limitados, la procuración dolorosa y con riesgos de infección. Por lo anterior, se han explorado nuevos abordajes experimentales para la obtención de una cantidad suficiente de hueso autólogo útil para autotrasplante como la ingeniería tisular basada en el uso de factores de crecimiento y células madre pluri-potenciales. Nosotros desarrollamos un modelo experimental de formación de hueso heterotópico en los músculos rectos del abdomen en perros. Este modelo consiste en implantes envueltos en epiplón constituidos por esponjas de colágena, polvo de hueso desmineralizado, cloruro de calcio, trombina y plasma rico en plaquetas como fuente de factores de crecimiento. Aunque este es un modelo eficiente para la formación de hueso heterotópico, no es adecuado para autotrasplante debido a que requiere al menos cuatro meses para la formación de hueso maduro. El objetivo de este trabajo fue acelerar la producción de hueso. Para lo anterior, primero se aislaron los constituyentes histológicos más representativos del hueso autólogo (tejido conectivo/inflamatorio periespicular, hueso maduro e inmaduro, tejido adiposo) y se purificó de estos el RNA total que fue utilizado a su vez para obtener la cinética de expresión genética de los principales factores de crecimiento y diferenciación por medio de RT-PCR. Posteriormente, los factores expresados en mayor cantidad y con mayor rapidez de síntesis fueron

producidos en hojas de tabaco. Nuestros resultados mostraron que las proteínas morfogénicas óseas 2 y 7, y el factor de crecimiento transformante- β 1 fueron los factores principales, y su incorporación como proteínas recombinantes en las esponjas de colágena favorecieron la formación de hueso heterotópico en sólo un mes, lo cual es de mayor utilidad en autotrasplante.

Summary

Trauma, osteomyelitis, bone tumour resections and treatment of congenital deformities are the main causes of bone deficiency. In these clinical situations autologous graft is the preferred treatment, but usually the bone supplies are limited and harvesting is painful and has risk of infection. Thus, in order to produce enough bone tissue for transplantation, several novel approaches are currently being explored, such as tissue engineering based in the use of bone growth factors and stem cells. We developed an experimental model of heterotopic bone formation in the subcutaneous abdominal area of dogs. This model consist in omentum wrapped implants constituted by collagen type 1 sponges that are embedded with demineralized bone powder, calcium clorhite, thrombin and platelets rich plasma that is a source of bone growth factors. Although this is an efficient model of heterotopic bone formation, it is not practical for transplantation because it need at least four months for complete bone formation. The aim of the present work was to improve this model by accelerating bone production. In order to do this, we first isolate using laser microdissection the most conspicuous histological constituents (connective/inflammatory tissue, immature and mature bone, adipose tissue) and purified from them total RNA that was used to determine by RT-PCR the gene expression kinetics of the most important growth and differentiation bone factors. Then, the most abundant and rapidly synthesized factors were produced in tobacco leaves. Our results showed that bone morphogenetic proteins 2 and 7, and transforming growth factor- β 1 were the most rapidly and highly synthesized factors,

and their incorporation as recombinant proteins in the scaffold collagen sponge induced in just one month mature heterotopic trabecular bone which could be useful for autotransplantation.

Indice general	
Programa de Doctorado en Biología Experimental	i
Miembros del Jurado y firmas correspondientes	ii
Miembros del Comité Tutoral, tipo de participación y adscripción	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	v
Summary	vi
Indice General	ix
I Marco Teórico	1
1.1 Histología del Hueso	1
1.2 El osteoblasto	2
1.3 El osteocito	3
1.4 El osteoclasto	3
1.5 Matriz Orgánica	5
1.6 Colágena	6
1.7 Aspectos básicos y Clínicos de la regeneración ósea	7
1.7 A) Células madre osteoprogenitoras	7
1.7 B) Factores de crecimiento y diferenciación en la Regeneración ósea	8
1.8 Ingeniería tisular del hueso y modelos de regeneración ósea	23

II Justificación	25
III Objetivos	27
IV Hipótesis	27
V Material y métodos	28
V.1 Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP)	29
V.2 Determinación de expresión genética de factores de crecimiento en compartimientos histológicos durante la formación del hueso heterópico por medio de captura con micro disección laser y RT-PCR	29
V.3 Producción de factores de crecimiento recombinantes en nicotianabentamiana	31
V.4 Ingeniería tisular	33
VI Análisis estadísticos	34
VII Resultados	34
VIII Discusión	39
IX Bibliografía	47

I MARCO TEÓRICO

El hueso es un tejido dinámico, altamente vascularizado, con capacidad única de regenerar, curar y remodelarse sin dejar cicatriz. El tejido esquelético proporciona la estabilidad del cuerpo, soporta la carga mecánica, permite el movimiento y protege los órganos internos. Además, el hueso es reserva de elementos minerales (calcio, fósforo) y tiene la capacidad de movilizarlos rápidamente para mantener la homeostasis(1).

1.1. Histología del Hueso

La diversidad de funciones requeridas por el tejido óseo se refleja en su compleja arquitectura y su alto recambio metabólico. Existen dos formas de tejido óseo: trabecular (hueso esponjoso) y compacto (hueso cortical). El hueso compacto es más sólido con una porosidad menor del 10% y se localiza en huesos largos, cortos y planos, mientras que el hueso trabecular tiene un patrón esponjoso, este tipo se localiza en la médula ósea, particularmente en las metafisis de los huesos largos, en el hueso ilíaco y en los cuerpos vertebrales (1). Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral. Histológicamente el tejido óseo está constituido por tres tipos principales de células: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Estas células están contenidas en una matriz compleja, compuesta por un componente mineralizado (hidroxiapatita) y otro orgánico no mineralizado representado por colágena y proteoglicanos, que participan en la organización estructural y en la inducción del crecimiento y diferenciación de las células óseas (1,2).

1.2. El osteoblasto

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplasmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la conexina 43. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Actualmente se sabe que los osteoblastos: 1.- sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, 2.- dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, 3.- contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina, 4.- median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y 5.- sintetizan factores de crecimiento. La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento o en osteocitos (15%). (2,3)

1.3 El osteocito

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular (1,2). De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurar oxígeno y nutrientes. Cuando se produce un trauma en el hueso el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que están a más de 0.1 mm de un capilar intacto. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción. Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en osteoblastos y células limitantes. (1,2)

1.4 El osteoclasto

Las células encargadas de la reabsorción son los osteoclastos. Se trata de células grandes (100Mm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas.

Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la defosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto in vivo como in vitro. Además tienen receptores para calcitonina. Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante las integrinas (1,2). La integrina del osteoclasto, particularmente $\alpha v\beta 3$, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como las colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa, etc, que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después. Respecto a la osteoclastogénesis actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de los osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3 moléculas clave: OPG (osteoprotegerina), RANKL (ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). El RANKL antiguamente llamado ODF (osteoclast differentiation factor) es una citoquina transmembrana

pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción (1,3). Asimismo, los efectos de RANKL tanto in vivo como in vitro son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores TNF. Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello OPG, RANK y RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis.(3)

1.5. Matriz orgánica

El hueso consiste de una matriz extracelular (MEC) rica en proteínas, células y una fase mineral. Esta MEC rica en proteínas es el reservorio principal de glicoproteínas osteogénicas del hueso, las cuales se fijan de manera importante a una malla matriz colagenosa. La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Esta formada fundamentalmente por proteínas y colágenas, entre las que destaca el colágeno tipo I (90%) La matriz juega un papel importante en el conjunto del sistema óseo, siendo evidente este hecho cuando aparecen enfermedades del colágeno como la osteogénesis imperfecta. Es sobre esta MEC de colágena donde cristaliza la fase mineral del hueso. Actualmente debe considerarse a la matriz mineralizada extracelular como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regularización de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo(2,3,4).

Importante mencionar que estas proteínas de colágena no tienen la

capacidad de inducción ósea, su función es estructural y de transporte como se ha mencionado.

1.6 Colágena

El 90% de la matriz extracelular (MEC) esta constituido por colágeno, sobre todo tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas. Contiene característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, siendo este último, un marcador específico de todos los tipos de colágeno y estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la reabsorción ósea. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

En los complejos procesos de desarrollo embrionario, crecimiento y remodelación ósea, también están involucrados una plétora de diferentes factores de crecimiento y diferenciación celular, cuya producción y actividad es coordinada por una compleja gama de interacciones celulares y con la matriz extracelular, como respuesta a estímulos externos o internos, acciones neuroendocrinas, autocrinas, paracrinas y endocrinas (2,3,4).

1.7 Aspectos básicos y clínicos de la regeneración ósea.

El tejido óseo tiene las capacidades singulares de crecimiento, remodelación y regeneración a lo largo de la vida. El fenómeno de regeneración ósea es un proceso de gran eficiencia y es el resultado de la interacción continua entre células óseas, matriz extracelular y factores de crecimiento y diferenciación (citocinas), que recapitulan los procesos del desarrollo embrionario. El proceso de remodelación ósea ocurre en condiciones de salud y en situaciones patológicas como las fracturas. El resultado final de la regeneración tisular es la formación de un tejido de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas semejante al original, en donde participan células, matriz celular y factores bioactivos(5,6).

1.7. A) Células Madre Osteoprogenitoras

Las células son esenciales para desarrollar y replicar el tejido normal, crean el medio ambiente y sintetizan una matriz extracelular de soporte. Las células osteoproducidas (osteoblastos) provienen de las células mesenquimatosas madre indiferenciadas, las cuales se diferencian en la línea osteoblástica por dos vías, una principal de células precursoras osteoprogenitoras determinadas (*DOPCs*) y la otra de células precursoras osteoprogenitoras inducibles (*IOPCs*). Las células de la línea *DOPCs*, se sitúan en las superficies óseas, en el “*cambium*” del periostio, el endosteo, la duramadre y el estroma medular peritrabecular(5,6). Las *IOPCs*, son células progenitoras pluripotenciales, capaces de diferenciarse en hueso, cartílago, tejido fibroso, muscular, adiposo y glial, se localizan en la médula ósea, el periostio o en los pericitos adheridos a la capa adventicia de los vasos, también derivan de las células del estroma

de la médula ósea, de los condrocitos, células musculares y adipocitos, estas son inducidas por factores de crecimiento y diferenciación solubles. La matriz extracelular es fundamental en el proceso de la regeneración ósea, debido a su arquitectura, propiedades mecánicas y/o biológicas que en conjunto ejercen una función organizadora, de guía de las células, y de liberación de moléculas inductoras para la morfogénesis. Además, la matriz ósea también es reguladora del crecimiento vascular interno y proporciona a las células osteoprogenitoras y osteoblásticas estímulos quimiotácticos, promueve la mitosis, modula la adhesión celular, la diferenciación y la mineralización (7,8,9).

1.7. B) Factores de crecimiento y diferenciación en la regeneración ósea.

Factor de crecimiento transformante beta

TGF- β *Funciones de TGF- β*

Entre las numerosas moléculas implicadas en los procesos de inflamación, destaca el factor de crecimiento transformante beta que es secretado por diversos tipos celulares (10).

La familia del TGF- β incluye un gran número de factores, estructural y funcionalmente relacionados, que actúan como reguladores multifuncionales de un amplio rango de procesos biológicos. Los miembros de la familia del TGF- β están implicados, entre otras cosas, en la morfogénesis, el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la regulación inmune, la reparación de tejidos, la inflamación y el cáncer (10) (Fig. 1). El primer miembro de la familia, TGF- β , fue descubierto en 1983 por su capacidad para “transformar” el

crecimiento de fibroblastos en cultivo (11,12). Hasta el momento, se conocen más de 40 miembros de esta familia entre los que se encuentran las proteínas morfogenéticas del hueso (*bone morphogenetic proteins*, BMPs), los factores de diferenciación y crecimiento (*growth and differentiation factors*, GDFs), el factor inhibidor Mülleriano (MIF), activinas o inhibinas (13).

El TGF- β es una proteína de 25Kda y es considerado como una citoquina multifuncional debido a los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares. Es el inhibidor más potente de proliferación en células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides, endoteliales y en varios tipos de células malignas. Alternativamente, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales a células no epiteliales y cierto tipo de células mesenquimales (14). Es también un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular (MEC) por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales; además, induce la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular. El TGF- β también induce otros eventos intracelulares, tales como la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular. En resumen, el TGF- β tiene un espectro muy amplio de funciones, las cuales dependen del estado de activación celular, de su concentración, del equilibrio de expresión de otras citoquinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa. Por este motivo, la distribución celular de su expresión *in situ* e *in vivo* está directamente asociada con el estado de diferenciación celular.

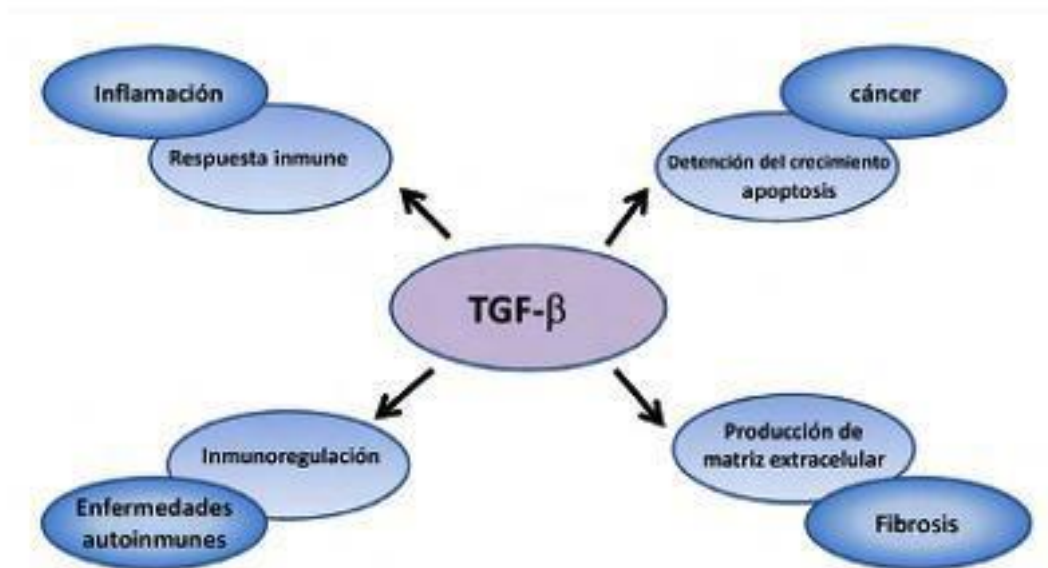


Figura1 . TGF- β como un regulador multifuncional. El TGF- β inhibe el crecimiento celular y promueve la apoptosis, estimula la producción de matriz extracelular, regula la proliferación y la diferenciación de células endoteliales y regula la proliferación, la diferenciación y la activación de células inmunes. La alteración de la señalización del TGF- β se ha relacionado con varias enfermedades humanas, como cáncer, fibrosis, inflamación y enfermedades autoinmunes.

Isoformas de TGF- β

Existen cinco isoformas del TGF- β , designadas como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y TGF- β 5. En mamíferos, se han descrito las isoformas 1, 2 y 3, codificadas en cromosomas diferentes (19q13, 1q41 y 14q24 en humanos, respectivamente). Las isoformas 4 y 5 se han identificado en aves y algunos mamíferos(15). Existe una homología del 70% de aminoácidos entre las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2, y del 79% entre las isoformas TGF- β 2 y TGF- β 3 (10). La comparación de las estructuras del TGF- β 1 y del TGF- β 2 muestran mucha similitud conformacional; sin embargo, hay diferencias notables en la estructura local y en la flexibilidad, lo cual puede estar relacionado con diferencias en la unión al receptor y en las señales de transducción inducidas (10,16).

Estructura y activación de TGF- β

Las tres isoformas del TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) son sintetizadas como proteínas precursoras inactivas y contienen nueve residuos de cisteínas en el extremo C-terminal. A partir de estos precursores se originan las formas maduras activas del factor. El precursor del TGF- β (Pro- TGF- β) es de 391 aminoácidos y son los 112 residuos localizados en el extremo carboxilo-terminal los que constituyen la forma madura. Los residuos restantes, localizados en la porción amino-terminal, constituyen el llamado péptido asociado de latencia o simplemente LAP (*latency associated peptide*) (Fig.2) (15). Como parte de su proceso de secreción, el pro-TGF- β sufre proteólisis, mediada por una endopeptidasa, la cual rompe el enlace peptídico entre el factor maduro y el LAP. El LAP tiene un papel importante para mediar el plegamiento correcto y la dimerización de las regiones maduras, y es necesario para un procesamiento postraducciona eficiente.

El TGF- β procesado es secretado como un complejo latente formado por la asociación no covalente entre el LAP y la región madura de la molécula. En el complejo latente el TGF- β carece de actividad, presumiblemente porque su asociación con el LAP le impide unirse a su receptor. Para que el TGF- β se active es indispensable que se disocie del LAP; este proceso puede producirse por varios factores, como cambios de temperatura o de pH (17). Una vez liberado, el TGF- β tiene una vida media corta. El TGF- β activo puede ser degradado por proteasas y elastasas en el sitio de la inflamación.

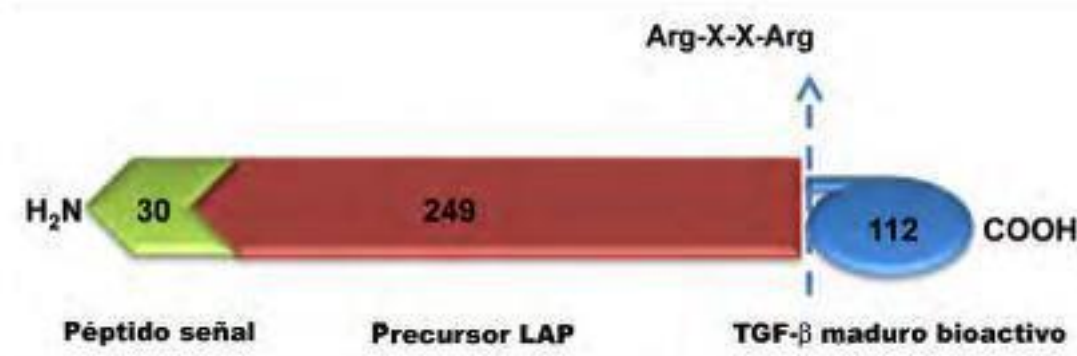


Figura 2 Representación esquemática de la estructura del pro-TGF- β . Una región N-terminal hidrofóbica que actúa como péptido señal (30 aminoácidos), la región del péptido asociado de latencia (LAP) (249 aminoácidos) y el C-terminal (112 aminoácidos), que corresponde con la región madura bioactiva del TGF- β . El punto de escisión entre el factor maduro y el LAP corresponde a una secuencia que incluye dos argininas separadas por dos aminoácidos. Imagen adaptada de "Role of transforming growth factor beta in corneal function, biology and pathology" Tandon et al. *Curr Mol Med.* 2010; 10: 565–578.

Receptores de TGF- β

Se han identificado tres tipos diferentes de receptores (R) para el TGF- β en humanos. Estos receptores pueden ser funcionales o no funcionales.

1) Los receptores funcionales: incluyen el tipo I, TGF- β RI con un peso molecular de 53 a 65 kDa, y el tipo II, TGF- β RII con un peso molecular de 83 a 110 kDa. Los receptores tipo I reciben otros nombres, uno de los cuales es receptor de activina tipo cinasa (*activin receptor-like kinase*, ALK). Existen algunas diferencias entre los receptores tipo I y II que se basan en la conservación de los dominios con actividad de cinasa y la presencia de un dominio serina/treonina (dominio GS) que se encuentra anclado a la membrana en el receptor tipo I y el cual es crítico para su activación (11).

Respecto a la cooperación entre TGF- β RI y TGF- β RII, existe una dependencia funcional entre ambos; el receptor TGF- β RI requiere de TGF- β RII para unirse al ligando, mientras que TGF- β RII requiere de TGF- β RI para la señalización funcional. En presencia del TGF- β , TGF- β RI y TGF- β RII tienen la

habilidad para interactuar uno con otro y formar un complejo tetramérico a través del cual se transducen las señales. Este complejo molecular es la unidad receptora de señales que media las repuestas biológicas del TGF- β (10,18). En este complejo, la región citoplásmica de TGF- β RII está constitutivamente fosforilada, y fosforila el dominio GS de TGF- β RI, lo cual induce su actividad quinasa (Fig.3). Las regiones intracelulares de ambos receptores tienen funciones distintas y ambas son necesarias para la transducción de señales (Massague 1996). Las regiones transmembranal y extracelular son requeridas por TGF- β RI y TGF- β RII para la activación dependiente del ligando. La unión del TGF- β estabiliza el complejo y genera respuestas fisiológicas adecuadas en una forma dependiente del ligando. La expresión anormal de TGF- β RI y TGF- β RII puede contribuir a la formación de complejos activos, produciendo una señalización independiente del ligando y, en consecuencia, respuestas celulares inapropiadas (18).

2) Los receptores no funcionales: incluyen el tipo III, TGF- β RIII de peso molecular 250 a 310 kDa, también llamado betaglicano, y la endogлина. Se consideran “co-receptores” del TGF- β , ya que aunque no son requeridos para la generación de su señal, son capaces de modularla al controlar la interacción del TGF- β con los receptores funcionales (11). El betaglicano tiene un gran dominio extracelular y un dominio de señalización intracelular corto y puede estar anclado a la membrana o ser secretado en forma soluble (17); se puede unir a todas las isoformas del TGF- β , y juega un papel selectivo al facilitar la interacción del TGF- β 2 con el TGF- β RII (19), ya que TGF- β 2 tiene menos afinidad por el TGF- β RII que TGF- β 1 o TGF- β 3 (15). La endogлина es similar a los betaglicanos y se une a los TGF- β 1 y TGF- β 3 (15).

Los efectos de las isoformas del TGF- β están asociados a su disponibilidad, a la combinación de los tipos de receptores y a la vía de señalización intracelular que inducen (20).

En ausencia de ligando, los receptores tipo I y II existen como homodímeros en la superficie celular. Los complejos del receptor son heterotetraméricos y consisten en dos receptores tipo II a los cuales se une el ligando, y dos receptores tipo I, que transmiten la señal de transducción. El ensamblaje del complejo heteromérico es iniciado por la unión del ligando y estabilizado por las interacciones entre los dominios citoplásmicos de los receptores tipo I y II.

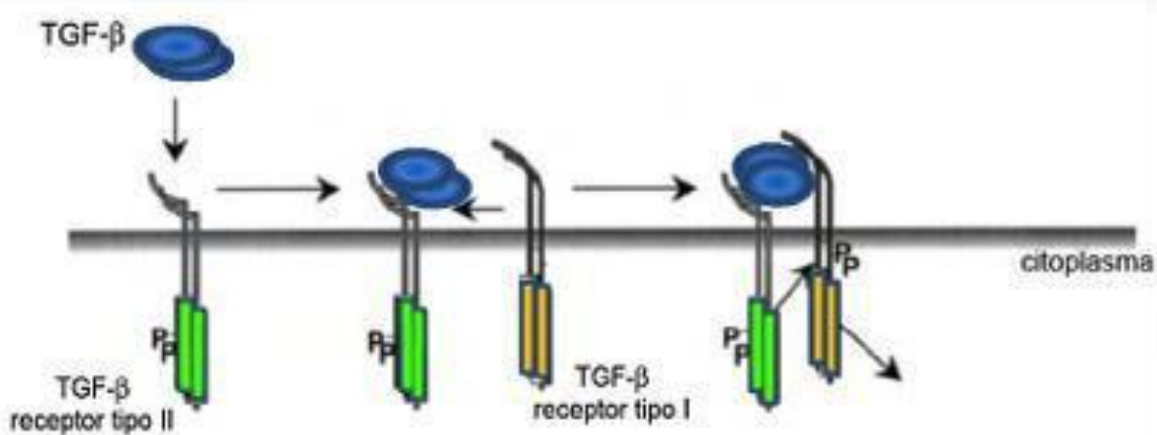


Figura 3 Activación de los receptores de TGF- β . El ligando se une inicialmente al RII de TGF- β . Esto puede ser reconocido por el RI, que es reclutado al complejo. Posteriormente, el RII-quinasa activo fosforila y activa el RI de TGF- β , que propagará la señal. Imagen adaptada de "Transforming growth factor β signal transduction" Dennler *et al.* Journal of Leukocyte Biology 2002; 71: 731-740.

Principales vías de señalización del TGF- β

El TGF- β funciona como una proteína reguladora transmitiendo su función de la superficie celular al núcleo a través de la transducción de señales moleculares.

Tras la unión a los receptores de la superficie celular, el TGF- β inicia la transducción de la señal a través de la fosforilación de proteínas citoplasmáticas. Esta señal es transportada al núcleo donde activa o reprime la

transcripción de genes diana que conducen a diferentes respuestas celulares.

La respuesta de señalización del TGF- β incluye tanto vías canónicas, a través de proteínas SMAD, como no canónicas (15). La integración de estas vías de señalización determina las respuestas celulares al TGF- β .

Vía de señalización canónica: señalización dependiente de proteínas SMAD

Las proteínas SMAD (homólogas de la proteína de *Drosophila*, *mothers against decapentaplegic* (MAD) y la proteína de *C. elegans*, SMA) han sido identificadas como las principales transductoras de la señalización del TGF- β , mediando la señalización del receptor desde la superficie celular hasta los genes diana en el núcleo.

Se han descrito ocho proteínas SMAD en vertebrados con tres funcionalidades distintas: 1) SMAD activadas por el receptor, o R-SMADs (SMAD-1,- 2, -3, -5 y -8), 2) SMAD mediadora común o C-SMAD (SMAD-4) y, 3) las SMAD inhibitorias o I-SMADs (SMAD-6 y 7) (21).

En esta vía, la fosforilación en el receptor tipo I activa a las quinasas que fosforilan a los factores de transcripción SMAD-2 y SMAD-3 en su segmento C-terminal; una vez fosforilados, se liberan del complejo del receptor y forman un complejo con SMAD-4 para trasladarse del citoplasma hacia el núcleo, donde interactúan de una manera específica con otros factores de transcripción como AP-1, regulando la transcripción de genes de respuesta al TGF- β para llevar a cabo sus funciones biológicas (Fig.4)

Las I-SMADs, o SMAD inhibitorias, tienen también un papel importante en la regulación de la respuesta inducida por TGF- β . La síntesis de las SMADs inhibitorias (SMAD 6 y 7) es inducida por el TGF- β , lo cual sugiere que hay un mecanismo de autorregulación negativa intracelular que regula la señal del

TGF- β (15). Las SMAD 6 y 7 interactúan con TGF- β RI en una manera más estable que las SMAD 2 y 3, compitiendo por la unión con el receptor. La sobreexpresión de las SMAD 6 o 7 inhibe la fosforilación de las SMAD 2 y 3 estimulada por el ligando, lo cual sugiere que las SMAD 6 y 7 tienen propiedades inhibitoras, ya que pueden bloquear la señalización en puntos tempranos de la vía de transducción de señal inducida por el TGF- β . En general, SMAD-7 puede ser considerada como inhibidor de la señalización de la superfamilia del TGF- β (22).

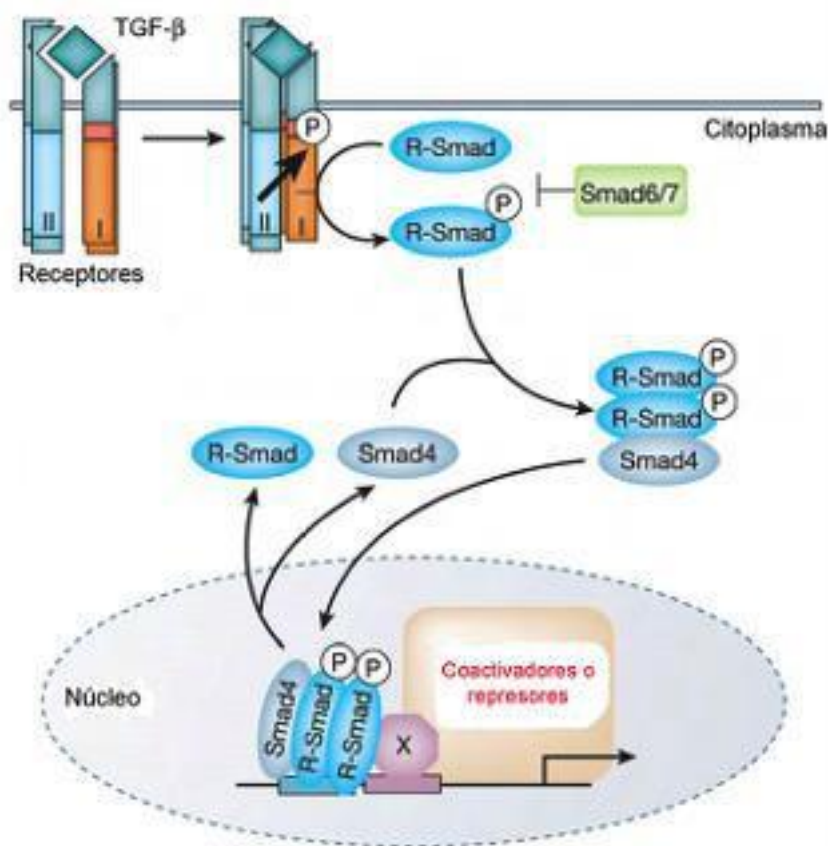


Figura 4. Modelo de la vía de transducción de señal canónica por SMAD inducida por el TGF- β . El TGF- β se une al TGF- β RII para formar un complejo activo con el receptor I. Este complejo tetramérico fosforila a las SMAD 2 y 3 (R-SMADs), las cuales se asocian con la SMAD 4. El complejo de las SMAD 2-3-4 activo es traslocado al núcleo donde funciona como un coactivador transcripcional de genes de respuesta al TGF- β . Las SMAD 6 y 7 pueden interactuar con TGF- β RI y RII e impedir que se fosforilen SMAD2 y 3. Imagen adaptada de "Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF- β family signaling" Derinck *et al.* Nature 2003; 425: 577-58.

Vías de señalización no canónicas: señalización independiente de proteínas

SMAD

Uno de los mecanismos subyacentes a la multifuncionalidad y la complejidad de la acción del TGF- β es que puede señalizar a través de otras vías no SMAD, tales como a través de la activación de las GTPasas pequeñas (Rho-like GTPasas), MAP quinasas (*mitogen-activated protein kinase*) (MAPK): p38, Jun N terminal quinasa (JNK) y la vía de señalización Ras-Erk- MAPK; la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K/Akt) así como la vía de la protein-fosfatasa PP2A (Fig.5)(23). Algunas de estas vías regulan la activación de SMAD pero otras podrían inducir respuestas no relacionadas con la transcripción. La activación inducida por TGF- β de las vías Erk y JNK puede producir la fosforilación de SMAD y regular su activación. Además, la activación inducida por TGF- β de la vía de señalización MAPK Ras/Erk puede inducir expresión de TGF- β , por tanto amplificando su respuesta e induciendo respuestas secundarias. La activación de MAPK por TGF- β puede afectar también respuestas de transcripción a través de efectos directos en factores de transcripción que interactúan con SMAD (24). Aunque esta convergencia a menudo produce cooperatividad, estas vías también pueden contrarrestarse una con otra (25). Así, el equilibrio entre la activación directa de SMADs y las vías de señalización MAPK a menudo define las respuestas celulares al TGF- β .

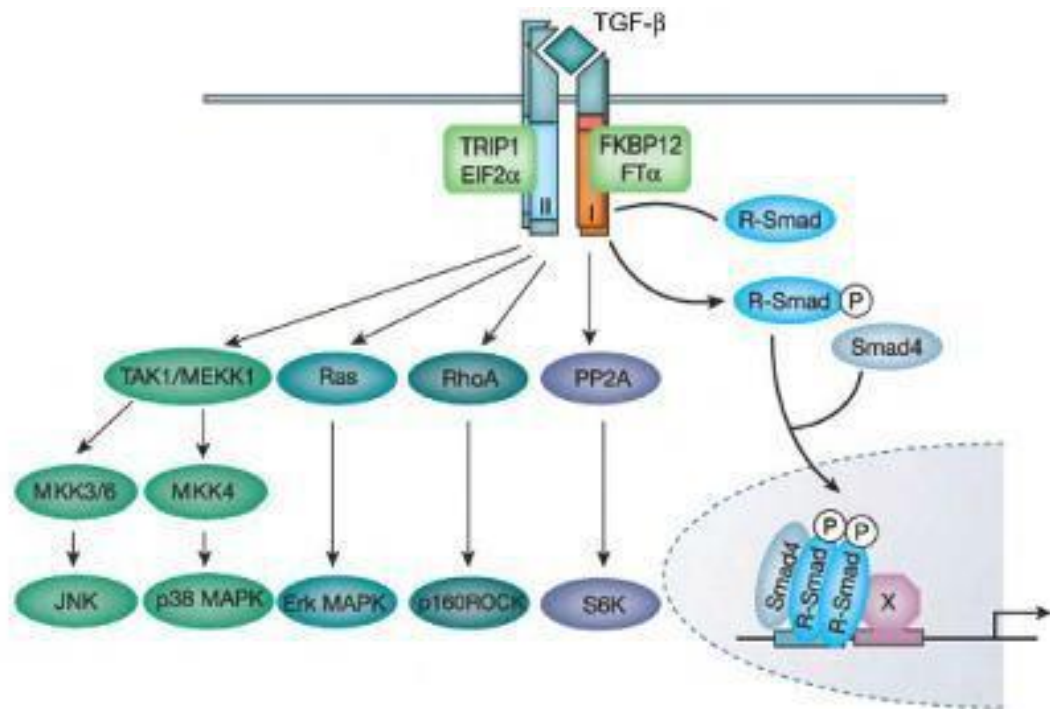


Figura 5. Vías de señalización no canónicas del TGF- β . Además de las proteínas que interaccionan con los receptores y SMAD, otras proteínas como TRIP1 y FKBP12 pueden asociarse con los receptores tipo I y II y regular la señalización del TGF- β . Además, el complejo receptor activado activa vías de señalización no-SMAD como MAPK, RhoA, TAK y PP2A. Imagen adaptada de "Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF- β family signaling" Derinck *et al.* Nature 2003; 425: 577-58.

Proteínas morfogénicas óseas

El conocimiento sobre proteínas que inducen la regeneración ósea se inició con el trabajo de Urist quién describió por primera vez la inducción de hueso ectópico, por la implantación de matriz ósea desmineralizada en músculo de roedores y propuso que este efecto era debido a la presencia de una proteína morfogénica de hueso (BMP) (26). Investigaciones posteriores demostraron que dichos factores se pueden extraer del hueso desmineralizado y actualmente se conocen más de 16 tipos de BMP(27).

Las proteínas morfogénicas óseas (BMP's) son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la super familia del factor de crecimiento transformante beta (TGFB). El papel de las BMP's en el desarrollo embrionario

y en las funciones celulares en el periodo posnatal de animales adultos ha sido estudiado de manera extensa en años recientes(27). Estudios en ratones transgenicos o ratones “knockout”, así como en animales y humanos con mutaciones ocurridas en los genes de BMP han demostrado que las BMP’s juegan un papel critico en el desarrollo cardiaco,neural, del cartílago y del hueso (28). Estas proteínas responsables de la inducción ósea permanecieron desconocidas hasta la purificación y secuenciación de la BMP-3 bovina (osteogenina), y la clonación de las BMP-2 y BMP-4 a final de la década de 1980 por Wozney(30). A la fecha más de 20 miembros de la familia de BMP han sido identificados y caracterizados. Solo las BMP 2 a la 7 son capaces de inducir el reclutamiento y proliferación de monocitos y células mesenquimales para inducir su diferenciación en osteoblastos (30,31). Las BMP 2 y 6 participan en la fase inicial induciendo la diferenciación de células mesenquimales a pro-osteoblastos, mientras que las otras BMP inducen la diferenciación terminal a osteoblastos (28,30,31).

Receptores de BMP

La señalización de las BMP es a través de receptores tipo 1 y 2 serina/treonina cinasa, los cuales ensamblan complejos fosforilados y activan a proteínas SMADS, efectores transcripcionales que determinan la activación o represión de genes específicos (27,31). Se han descrito tres receptores tipo I y tres receptores tipo II respectivamente . Mientras el receptor de tipo I BMPR-IA, IB y II son especificos de BMP’s, los receptores ActR-IA, II y IIB son también receptores de señal para activinas, Estos receptores se expresan de manera diferenciada en varios tejidos. Los receptores de BMP tipo I y II son

indispensables para la transducción. Después de unirse a sus ligandos forman un complejo heterotetramérico-activado que consiste en dos pares de receptores tipo I y II. El sustrato de BMR-I incluye a una familia de proteínas, las proteínas Smad cuyo papel es esencial para la transmisión de la señal desde los receptores de BMP hacia los genes blanco en el núcleo(27). Smad1,5 y 8 son fosforiladas por receptores BMP de manera ligando-dependiente. Después de su liberación del receptor, las proteínas Smad fosforiladas se asocian con la proteína relacionada Smad4, la cuál actúa como un socio compartido. Este complejo se transloca en el núcleo y participa en la transcripción de genes junto a otros factores de transcripción(15,27). (Fig 6)

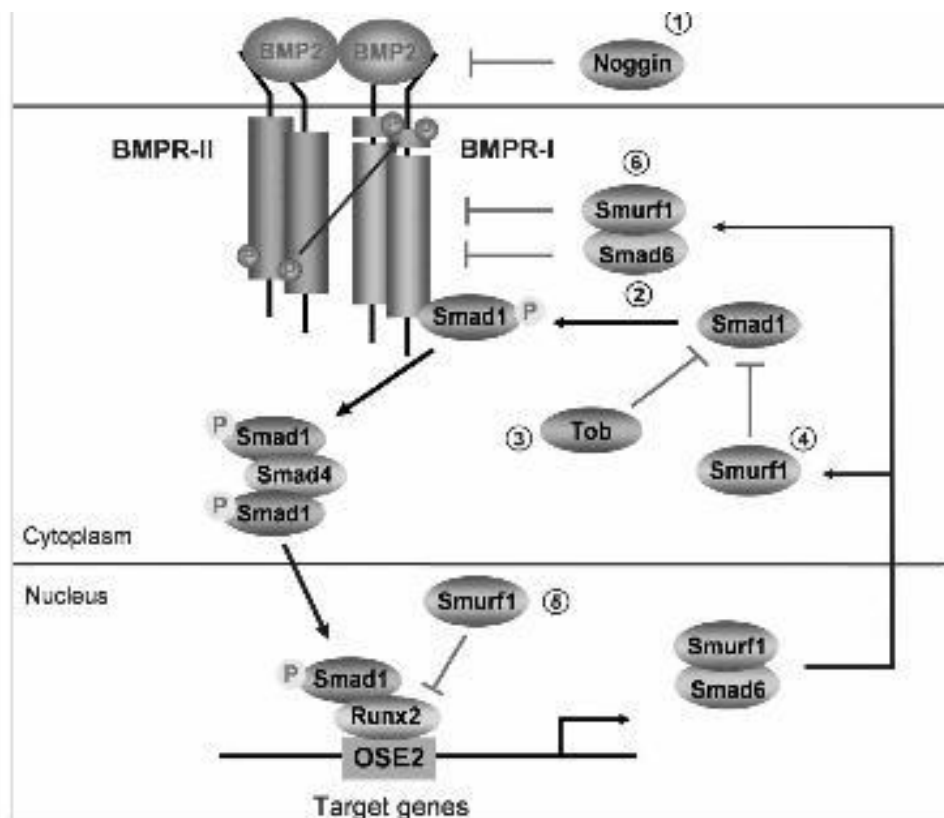


Figura 6 Señalización de BMP y su regulación. La acción de las BMPs son mediadas por receptores tipo I y tipo II y sus moléculas secundarias Smad 1, 5 y 8.

Funciones Biológicas de BMP's

Las BMP's se han implicado en una gran variedad de funciones. Inducen la formación de hueso y cartílago y tienen por igual un papel en procesos de desarrollo en tejidos diferentes al óseo(15). La inducción neural representa el primer paso en la determinación del destino de las células ectodérmicas. En los vertebrados, las BMP's actúan como señaladores de la inducción ectodérmica. BMP-2 dirige el desarrollo de las células de la cresta neural en los diferentes fenotipos neuronales, mientras BMP-4 y 7 inducen de manera específica el fenotipo adrenérgico simpático(31,32). Por igual, las BMP's dirigen el desarrollo de las somitas al inhibir el proceso de miogénesis(32).

Regulación negativa de las BMP's

Las BMP's son estimuladores potentes de la formación ósea y de otras funciones celulares. La actividad de BMP's es controlada en diferentes niveles moleculares: primero, una serie de antagonistas de BMP que se fijan a sus ligandos e inhiben las funciones dependientes de BMP's, segundo Smad6 es un miembro de la familia Smad. Se une al receptor de BMP tipo I y previene la fosforilación y conjugación de Smad1 y 5; tercero, proteínas anti proliferación como *tob*. Se fija de manera selectiva a las proteínas Smad1 y 5 e inhibe la señalización de BMP en los osteoblastos(27). Finalmente el factor regulador de ubiquitina Smad (*Smurf1*) es una ligasa de ubiquitina E3. Esta interactúa con Smad1 y 5 mediando la degradación de estas proteínas. Por otro lado, un inhibidor de BMP's por excelencia es la proteína *Noggin*(27). Este es un polipeptido secretado que se fija e inactiva a las BMP-2, BMP-4 y 7. Estructuras cristalinas relacionadas de *Noggin* y BMP-7 demuestran que la inhibición de

BMP's se da por medio del bloqueo de las interfases moleculares de los epitopes fijadores de los receptores de BMP, tanto tipo I como tipo II. Hasta el momento se han descrito siete mutaciones del gen Noggin en familias no relacionadas que presentan alteraciones de la morfogenesis de las articulaciones. Se han reportado modelos en ratones transgénicos que resaltan la importancia de Noggin. En un experimento se utilizo el promotor osteocalcina como vehiculo del transgen de Noggin(27). Los animales desarrollaron osteoporosis. Se observaron disminuciones importantes en la densidad mineral osea, y en los índices de formación y volumen oseo. Smad6 es otro miembro de la familia Smad cuyo papel es de regulación negativa del señalamiento de BMP al fijarse de manera estable a los receptores de BMP tipo I. Smad 6 interfiere con la fosforilación de proteínas Smad1 y 5 y la subsecuente heteromerización con Smad4. La sobre expresión de Smad6 en los condrocitos da como resultado retraso en la diferenciación y maduración de los mismos(33). Otro mecanismo regulatorio de importancia corresponde a la degradación de proteosomas mediado por ubiquitina. Esta vía proteolítica es de suma importancia para diferentes procesos biológicos incluyendo la progresión del ciclo celular, la trasncripción genetica y transducción de señales. La formación de conjugados de proteína-ubiquitina requiere de una cascada donde participan tres enzimas de transferencia: enzima ubiquitina-activadora (E1), enzima ubiquitina-conjugante (E2) y ubiquitin ligasa (E3). La especificidad de ubiquitinación proteica esta determinada por la E3, quienes definen de manera crucial la especificdad del sustrato y degradación proteica subsecuente por medio de los proteosomas 26S. El Smurf1 media la degradación de las proteínas Smad1 y 5. Se ha demostrado por igual, que Smurf1 participa por

igual en la degradación del factor de transcripción Runx2/Cbfa1. Este último interactúa con la proteína Smad1(30,34).

1.8 Ingeniería tisular del hueso y modelos de regeneración ósea.

El entendimiento de los conceptos de la biología celular y tisular, así como los avances en la cirugía experimental han permitido conocer y comprender los procesos de crecimiento, diferenciación y desarrollo de tejidos y órganos de los vertebrados(35). Esto ha servido de plataforma para relacionar las áreas de la biología molecular y celular con la cirugía experimental y la ciencia de los biomateriales que en conjunto han dado paso a la emergente ciencia de la ingeniería tisular. El entendimiento del fenómeno de la “formación de hueso por medio de auto-inducción” ha sido pivote para establecer las reglas de la ingeniería tisular, que se traducen en la inducción de formación de tejidos por medio de la combinación de protocolos moleculares donde señales insolubles o sustratos se combinan con señales moleculares solubles que favorecen e inician la cascada de la inducción de tejidos y su morfogénesis (35). Son tres los ingredientes claves para la llevar a cabo ingeniería tisular, a saber: señalizadores solubles, células madre reactivas, y la matriz extracelular. La matriz extracelular es el microambiente que puede duplicarse funcionalmente por medio del ensamble supramolecular de nuevos materiales biomiméticos (35). Está bien establecido que al remover la fase mineral del hueso por medio de ácido (desmineralizando), se consigue exponer las glicoproteínas osteogénicas de la matriz colagenosa (36). Este hueso desmineralizado resultante es llamado matriz ósea desmineralizada(DBM) y es esta la que lleva a la inducción de formación del hueso endocondral en sitios extra esqueléticos

(heterotópicos) en diversos modelos animales (36). Urist reconoció la importancia de la desmineralización de la matriz ósea para inducir la formación de hueso de manera heterotópica y propuso la presente terminología (proteínas morfogénicas del hueso), hipotetizando en ese entonces la presencia de un complejo de BMP's dentro de la matriz ósea(27).

A partir de los conceptos revisados, varios investigadores han propuesto y desarrollado diferentes experimentos y modelos de regeneración ósea con resultados contrastantes. Probablemente el modelo más representativo es el de inducción ósea por medio de implantes ectópicos en mamíferos no humanos como *P. ursinus* realizado por Ripamonti (36,37) . En este modelo los autores colocaron un implante de hidroxiapatita en el músculo recto del abdomen de babuinos (*P. ursinus*), adicionando las tres isoformas recombinantes de TGF-B en dosis de 5, 25 y 125 mgr/100 mg de matriz colágena insoluble, con lo cuál consiguieron la formación de fragmentos óseos consolidados a los 90 días. Los autores demostraron la importancia de la combinación de señalizadores solubles (TGFb) e insolubles, así como la presencia de una matriz extracelular (hidroxiapatita)(36). Por el contrario, se ha observado que la adición de isoformas de TGFb en roedores, conejos y perros no favorece la inducción ni el desarrollo de hueso(38,39), datos contrastantes con los resultados obtenidos en mamíferos. En México, Ascencio y colaboradores utilizando técnicas de ingeniería tisular desarrollaron un modelo experimental de regeneración ósea. Este modelo consiste en la utilización de esponjas de colágena a las que se agrega plasma rico en plaquetas, trombina, polvo de hueso desmineralizado y cloruro de calcio, lo cual produce una masa blanda y moldeable que permite darle una forma específica (42). Dicho molde se implanta en la cavidad

abdominal de perros envuelta en epiplón. El sitio anatómico elegido para desarrollar dicho modelo experimental fue la pared abdominal, por la facilidad de abordar la zona y por el control visual cualitativo y cuantitativo de la evolución de los tejidos neoformados. El tejido elegido para vascularizar el implante fue el epiplón mayor, los factores bioactivos se obtuvieron del plasma enriquecido en plaquetas (factores de crecimiento involucrados en la reparación y regeneración tisular) para acelerar los procesos de restitución tisular. La matriz extracelular representada por la esponja de colágena proporcionó un sitio de migración para las células progenitoras derivadas del tejido adiposo del epiplón y de la sangre circulante, proporcionando el espacio a las células osteoblásticas para sintetizar su propia matriz orgánica y servir como vehículo para la liberación de factores bioactivos, finalmente la matriz se reabsorbió. De esta forma se reunieron los tres elementos biológicos básicos, células madre, matriz extracelular y factores de diferenciación, los cuales produjeron hueso heterótopico, pues después de 4 meses, dicho molde fue constituido en el 70% por hueso trabecular. Estudios posteriores de inmunohistoquímica mostraron producción local de factores de crecimiento como TGF y BMP(4).

II Justificación

La regeneración ósea *in-vivo* es un proceso biológico muy eficiente, pues en general se produce espontáneamente con una mínima intervención médica.

Sin embargo, de las 6 millones de fracturas que ocurren cada año en los Estados Unidos, el 5 a 10% requerirán de tratamiento médico especializado debido a diferentes complicaciones, como interposición de tejidos blandos,

inapropiada fijación de la fractura, pérdida de hueso, alteraciones metabólicas, infecciones y disminución de riego sanguíneo (43,44). Además, en ciertas situaciones médicas, grandes cantidades de tejido óseo deben de researse, como es el caso de la extirpación de tumores benignos o malignos, osteomielitis, deformaciones óseas y pérdida del área maxilo-facial. Es en estas situaciones en las que el hueso autólogo obtenido del mismo paciente para autotransplante es necesario y en general la cresta iliaca ha sido el sitio de elección para la obtención del hueso donador (43). Los injertos tomados de este sitio son osteoconductivos (proveen una matriz sobre la cual las células osteoblasticas proliferan), son también osteoinductivos (inducen proliferación y diferenciación de células indiferenciadas en osteoblastos) y son osteogénicos (proveen un reservorio de células madre osteoprogenitoras formadoras de hueso). Sin embargo, la disponibilidad de hueso para usarlo como transplante autólogo es limitado y su obtención genera problemas serios para el paciente, como dolor e infecciones agregadas. Es necesario por lo tanto y esta plenamente justificado desarrollar técnicas alternativas que eviten estas complicaciones.

En el pasado, los cirujanos usaban bancos de hueso y substratos naturales o sintéticos para substituir al tejido óseo, lo cual tiene importantes limitaciones debido a que este material no permite del todo la migración de células osteo-productoras (44). Por estas razones, nuevos tratamientos son actualmente explorados, incluidos el uso de factores de crecimiento y células madre (39). En este proyecto se propone el uso de una estrategia quirúrgica para la formación de hueso heterotópico, producido por el mismo paciente a través de la

estimulación de la línea osteoblastica con factores de crecimiento específicos obtenidos por técnicas de transfección de genes en plantas.

III Objetivos

Objetivo General

Obtener hueso heterotópico útil para autotrasplante a partir del modelo experimental en un menor tiempo y mayor cantidad.

Objetivos Particulares

Definir y estandarizar la técnica de obtención del plasma rico en plaquetas en el perro criollo y favorecer la activación de las mismas para la liberación de factores de crecimiento.

Determinar la cinética de expresión de factores de crecimiento en el hueso neoformado útil para autotrasplante por medio de microdissección con laser.

Suplementar factores de crecimiento y diferenciación ósea BMP 2 y 7, factor de transformación tumoral beta, factor de crecimiento endotelial y fibroblástico, el modelo experimental de formación de tejido óseo heterotópico.

IV Hipótesis

“Si se suplementan factores de crecimiento recombinantes obtenidos de plantas en el modelo experimental de Ascencio; la producción de hueso será mayor y obtenida en un menor tiempo”

V Material y Métodos

III.1 *Modelo experimental de formación de hueso heterotópico*

Se utilizaron 14 perros criollos adultos, con peso entre 15 y 20 Kg, desparasitados y libres de enfermedades infecciosas. Se realizó inducción anestésica con 1.5 mg/kg de rompum (xilacina) y 16mg/kg de anestésal (pentobarbital), 0.5 mg/kg de peso de atropina, se llevo a cabo intubación endotraqueal. La anestesia general se mantuvo con inhalación de ethrane (enflurane) al 2%. Se practicó tricotomía de pared abdominal y se protegieron los globos oculares. En condiciones asépticas y en posición de decúbito dorsal, en el abdomen se practicó una incisión en la línea media, se abordó la cavidad abdominal, se identificó la curvatura mayor del estómago y el epiplón mayor y se formaron dos colgajos de epiplón, uno derecho y otro izquierdo con pedículos de la arteria gastroepiplóica derecha. Se electrocoagularon los vasos sangrantes. Sobre los músculos rectos abdominales, se practicaron dos incisiones paramedias, izquierda y derecha, para permitir la emergencia de los colgajos de epiplón sobre los músculos rectos abdominales y se disecó un espacio para formar una cavidad entre el músculo y el tejido celular subcutáneo para colocar sobre la pared abdominal los colgajos. En cada uno de los colgajos de epiplón se incluyó polvo de hueso desmineralizado liofilizado de bovino de 5 mm y con porosidad de 100 a 300 micras, éste se envolvió en esponja de colágena tipo I, (fibroquel biomaterial compuesto de colágena tipo I y polivinilpirrolidona) aplicando 5ml de plasma enriquecido en plaquetas (PRP), 3ml de trombina (10.000 UI), cloruro de calcio 14.7 mg (2.5 ml). Cada perro permaneció en una perrera aislado para evitar agresiones en el área

correspondiente del bioterio. Se suministró alimentación y agua ad libitum, con el alimento convencional. Se debe aplicó sobre la herida el antiséptico isodine en solución durante la primera semana postquirúrgica. El manejo de los animales de experimentación seguirán bajo estricto apego la NOM sobre animales de experimentación.

A los 7,14, 30, 60, 90,120 días, días posteriores a la formación del implante se tomaron los especímenes de ambos colgajos. Los sacrificios se realizaron con una dosis letal de pentobarbital sódico (60-80 mg/kg de peso intravenoso). Dos perros se sacrificaron en cada uno de estos tiempos

V.1 Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP)

Se realizó una sangría a cada perro en el preoperatorio temprano. Se extrajeron 50 cc de sangre tomados de la vena radial. El producto fue suspendido en un tubo cónico de 60 cc adicionando previamente 5 cc de anticoagulante tipo citrato. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a diferentes revoluciones para determinar la velocidad y el tiempo ideal que permitió la separación de los componentes sanguíneos y a su vez dio como resultado la mayor cantidad de plaquetas en la fase de PRP. Se tomaron 2cc de sangre y se midió con la ayuda de un citómetro la cantidad de plaquetas por mm³.

V.2 Determinación de expresión genética de factores de crecimiento en compartimentos histológicos durante la formación de hueso heterópico por medio de captura con micro disección laser y RT-PCR

La expresión en mosaico de los factores de crecimiento y diferenciación como lo son las BMPs durante la esqueletogénesis indican que en el esqueleto y huesos específicos existen varias regiones con expresión de diferentes isoformas de estos factores, y que esto pudiera tener una significancia terapéutica(45). Nosotros hipotetizamos que una situación similar debería existir durante la formación de hueso heterópico. Por lo anterior se disecaron las áreas histológicas más representativas durante el curso de la formación del hueso heterópico en los implantes abdominales y se determino por medio de RT-PCR la expresión de diferentes factores de crecimiento óseo.

Los implantes abdominales fueron procurados y disecados después de 7, 14, 30, 60, 90 y 120 días de su implantación. Cada implante se dividió en cuadrantes para histología convencional y se fijaron de manera inmediata en solución paraformaldehído al 4% diluido en solución salina fosfatada. Después de tres días de descalcificación con ácido fórmico, el tejido fue incluido en parafina, seccionado, y teñido con hematoxilina y eosina. De cada cuadrante se obtuvieron al menos dos cortes. En estas laminillas, los tejidos más representativos fueron el tejido conectivo-inflamatorio, tejido adiposo y el osteoide o hueso trabecular maduro en el cual se detectó previamente por medio de inmunohistoquímica la expresión de BMP y TGF β_1 (42). Por lo tanto se realizó captura con disección laser de estas áreas por separado y bajo visualización microscópica directa. El tejido de las secciones seleccionadas fue fusionado dentro de una película termoplástica montada en una tapa LCM óptica transparente utilizando el equipo Arcturus XP (Arcturus engineering Mountain View, CA, USA) (46,47). Las películas termoplásticas que contenían las células del tejido micro disecado fueron utilizadas para aislar RNA total

utilizando NReasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para eliminar la contaminación genómica del ADN, las muestras de RNA fueron tratadas con DNasa (4U; DNA-free, Ambion). La calidad y la cantidad de RNA fueron evaluadas por medio de espectrofotometría (260/280 nm) sobre geles de agarosa. Se realizo transcripción inversa del mRNA utilizando 5 mg RNA, oligo.dT y el kit Omniscript (Qiagen). Se realizo PCR en tiempo real utilizando el sistema 7500 RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y Quantitect SYBR Green Master-mix kit (Quiagen). En cada corrida de PCR se incluyeron curvas estándar de producto de PCR cuantificado y diluido, así como controles negativos. Se diseñaron Primers específicos utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems) para los siguientes objetivos: TGF- β_1 F: ATG TCA CTG GAG TCG TGA GGC. TGF- β_1 r: CCT CGA CTT CCC CTC CAT G. BMP 2 F: AGC CTG GCC AAC ACC GT. BMP 2 R: CAA AGA TTC TAA TTC TTC GT. BMP 7 F: GCA GGA CTT GAT CAT CGC TC. BMP 7 R: CCC TCA CAG TAG TAA GCG CGA. IGF 1 F: CAA TTG CTG TTG GGT CGT CA. IGF 1 R: CGC TGA ACA GGG CTT CTG TA. IGF 2 F: GGA CAG CCT GCT TGC TCA AT. IGF 2 R: TTC ACT TGC TCG CAG TTT TCC HPRT F: GGA CAG TAG GAC TGA GCG GCT. HPRT R: CTA CGA TGT GAT GGC CTC CC.

V.3 Producción de factores de crecimiento recombinantes en Nicotianabentamiana

Nuestro estudio de la cinética de expresión genética de los factores de crecimiento demostró que BMP-2 fue el factor con la más rápida y alta expresión, seguido de BMP-7 y TGF- β_1 . Por lo tanto se obtuvieron estos como

proteínas recombinantes en plantas. Las secuencias utilizadas (TGF GenBank: X022812.1 TGF, BMP2 nm_001200.2, BMP7 NM_001719.2) fueron optimizados para la expresión en plantas y sintetizados por el Genscrip5-----
-----terminación para clonación. Todas las secuencias que contenían una etiqueta 6cHis en la terminación 3´prima fueron flanqueados con sitios BsaI y clonados en el vector pICH31070. Todos los vectores de expresión fueron donados por el Dr. Yuri Gleba (Icon Genetics). En todos los casos los vectores con los genes de interés fueron manejados en *Escherichia coli* DH5. La orientación y codones para todas las edificaciones fueron confirmadas por análisis de restricción y secuenciación. Los vectores fueron transferidos dentro de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. La infiltración de *Agrobacterium* en plantas de *N.benthamiana* ha sido descrita previamente (48). En breve, se realizaron cultivos nocturnos de *Agrobacterium* los cuales crecieron en medio YENB para una densidad celular alta (OD600 = 0.6) y fueron diluidos en buffer de infiltración (10 mM MES, pH 5.5; 10 mM MgSO₄) para alcanzar la concentración deseada. Se infiltraron suspensiones bacterianas en hojas de plantas utilizando vacío *vacuum*. Después de una infiltración, las plantas fueron incubadas en cajas de cristal por diez días. Las hojas fueron procuradas, se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C. De manera subsecuente fueron laceradas y re-suspendidas en buffer de extracción (10 mM PBS pH 7.4, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA pH 8.0, 0.01% Triton X-100, 50 mM ascorbato de sodio, 100 mM PMSF, 100 mM DTT) a una relación 1:1 (v/w) y centrifugadas (800 x g) por 20 minutos a 4°C. Se retuvo el sobrenadante y la concentración de proteína soluble normal se determinó por medio del método de Bradford (Bio-Rad) con BSA como estándar. Para la

purificación de los factores de crecimiento, los extractos fueron cargados en una columna HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences), la columna fue lavada y las proteínas con la etiqueta 6xHis eluidas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las fracciones fueron colectadas y analizadas por medio de SDS-PAGE. Aquellas fracciones que mostraban el factor en la forma más pura fueron colectadas y almacenadas.

V.4 Ingeniería Tisular

En dos experimentos independientes se utilizaron 8 perros criollos para la evaluación de la formación de hueso heterópico en implantes con factores de crecimiento recombinantes. Siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente, en el lado derecho se realizaron dos implantes, en el implante superior se agregaron 2cc (200 mg) de BMP-2 recombinante, en el implante inferior se agregó la misma cantidad de BMP-7, mientras en el lado izquierdo se realizaron tres implantes, en el implante más alto se agregó la misma concentración de TGF- β_1 , en el implante medio se agregaron los tres factores de crecimiento en las mismas dosis y el implante inferior fue el control sin factor recombinante. Los implantes derechos e izquierdos fueron extraídos después de una y cuatro semanas y evaluados histológicamente para formación ósea.

El porcentaje de tejido del implante conformado por hueso trabecular fue determinado por medio de morfometría automatizada como se describió previamente (42).

VI. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba T-Test Student's para determinar la significancia estadística de la expresión del factor de crecimiento óseo y la histomorfología. Se consideró significativa $p < 0.05$.

VII RESULTADOS

Plasma Rico en Plaquetas

Se realizó un estudio piloto con 30 sangrías de 50 cc en 20 perros. Determinando el tiempo y velocidad de centrifugación que resultara en un mayor conteo de plaquetas por mililitro. Se encontró que un centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos ofrece un conteo plaquetario de entre 1000000 y 1200 000 por mililitro de PRP. De acuerdo con estos resultados, este fue el método de preparación para todos los experimentos

Cinética de expresión genética de factores de crecimiento durante la formación de hueso heterotópico.

Los tipos de tejido más representativos fueron el tejido conectivo con inflamación crónica localizado alrededor del hueso trabecular (periespicular), hueso trabecular maduro u osteoide y el tejido adiposo proveniente del epiplón. Estas áreas de tejidos bien definidos fueron capturadas por medio micro disección laser y utilizados para aislar RNA el cual fue procesado para determinar la expresión de los diversos factores de crecimiento por medio de RT-PCR. La figura 6 muestra que en el tiempo más temprano, 7 días de implantación, el factor con la mayor expresión en el tejido conectivo inflamatorio periespicular fue BMP-2, mientras en el tejido adiposo la expresión

de BMP-2 alcanzo su pico después de las dos semanas de implantación, siendo el número de copias similar a las expresadas en el osteoide después de una semana. Posteriormente la expresión de BMP-2 declinó de manera progresiva en los tres diferentes tejidos. TGF- β_1 , por igual, tuvo una alta expresión después de una semana de implantación en el hueso inmaduro, y esta expresión fue dos veces mayor después de dos meses cuando se logró la producción de hueso trabecular consolidado, mientras en el tejido conectivo periespicular, el pico de expresión de TGF- β_1 se presento después de dos y cuatro semanas de implantación. Después de cuatro meses la expresión fue similar en los tres diferentes tejidos (Figura 7).

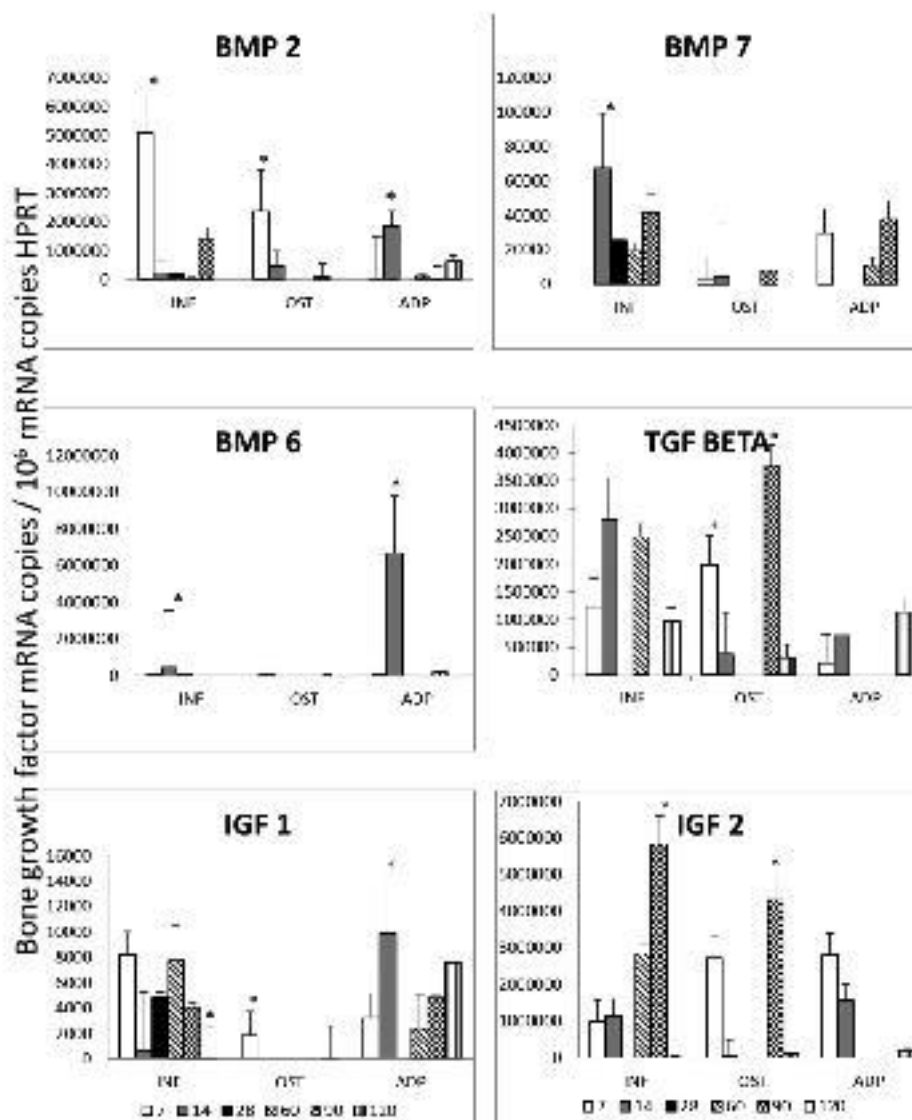


Fig 7. Cinética de expresión genética de factores de crecimiento óseo durante la formación de hueso heterotópico en implantes abdominales. La trabécula ósea (OST), tejido periespicular (INF) y el tejido adiposo (ADP) fueron aislados por medio de micro disección láser y utilizados para extraer RNA total y determinar por medio de RT-PCR la cantidad de factor de crecimiento durante la formación de hueso. Los números indican el día cuando el implante fue obtenido después de la implantación. Los resultados se expresan en medias y desviaciones standar de tres perros en los tiempos indicados.

La cinética de expresión de BMP-7 fue diferente, este factor tuvo su más alta expresión en el tejido periespicular después de dos semanas, seguido por una disminución temporal, y un posterior incremento después de 60 días, mostrando niveles de expresión similares en el tejido adiposo, mientras una pequeña y estable expresión fue detectada en el hueso trabecular. BMP-6 se expresó únicamente después de una semana en los tejidos periespicular y adiposo (Figura 7). IGF-2 por igual mostró una cinética de expresión diferente, exhibiendo su más alto nivel de manera tardía después de tres meses de implantación tanto en el tejido periespicular como en el tejido óseo, mientras en el tejido adiposo alcanzó su pico después de una semana. Por el contrario, IGF-1 mostró una baja y constante expresión (Figura 7).

Producción de BMP-2, BMP-7 y TGF- β_1 recombinantes en plantas de tabaco, y su efecto en la inducción de hueso heterotópico.

Como se muestra en la figura 8, BMP-2, BMP-7 y TGF- β_1 fueron producidos satisfactoriamente en las plantas de tabaco. Después de su purificación, la misma cantidad de cada factor de crecimiento se agregó a los implantes, y la producción de hueso fue evaluada después de una y cuatro semanas. Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico. No hubo casos de infección del sitio quirúrgico y la inflamación fue mínima. Durante la resección quirúrgica ambos implantes mostraron una excelente vascularización, escasas

adherencias, lo que permitió una rápida extracción de los implantes. Los implantes de control sin proteínas recombinantes mostraron una precaria formación de hueso, equivalente a menos del 5% después de un mes de implantación (figura 9 y 10). En contraste, los implantes que tuvieron factores de crecimiento recombinantes mostraron formación de hueso trabecular desde la primer semana de implantación, siendo 3%, 12% y 40% en implantes con BMP-2, BMP-7 y TGF- β_1 . EL porcentaje de formación ósea aumento de manera progresiva siendo mayor de 80% después de un mes con TGF- β_1 , seguido por 60% y 45% en los implantes con BMP-2 y BMP-7 respectivamente en el mismo tiempo. Por lo anterior una formación ósea significativa y más rápida fue inducida por la adición de los factores de crecimiento recombinates, siendo TGF- β_1 el más eficiente. De manera interesante la adición de los tres factores en el mismo implante demostró inducir una menor producción de hueso heterotópico en comparación con los implantes que recibieron cada factor de manera independiente.

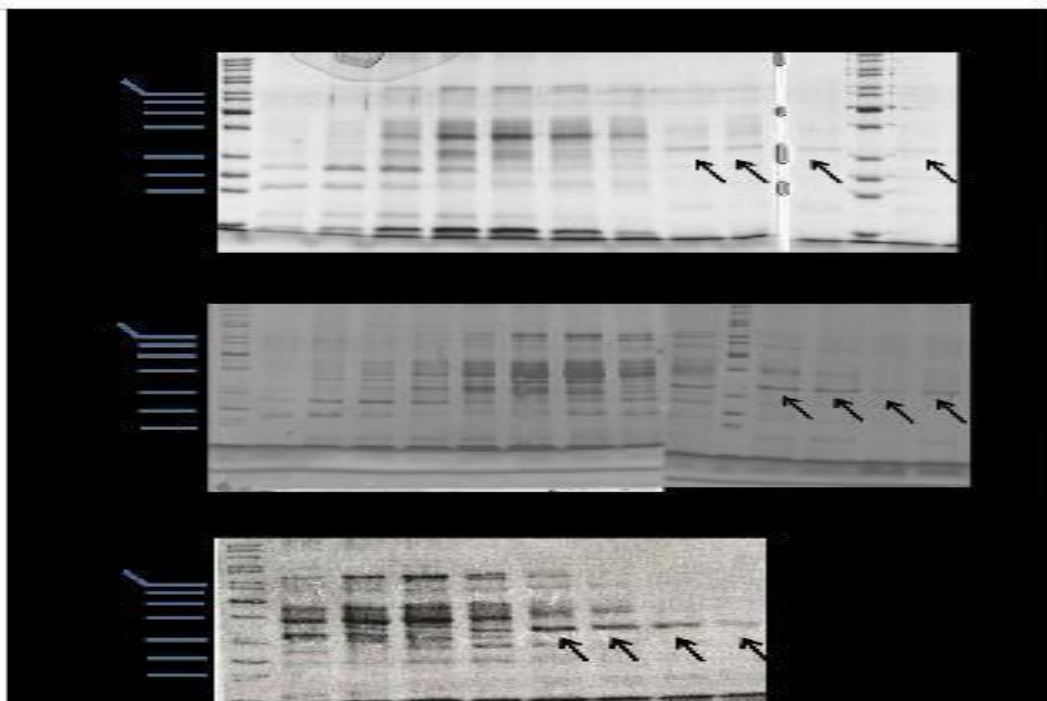


Fig.8 Purificación de BMP-2, BMP-7 y TGF- β 1, a partir de hojas de *Nicotianabenthamiana*. Los extractos crudos de plantas que contenían cada factor fueron filtrados en membranas de 0.2 Mm y cargados en columnas HisTrap HP. Cada factor se filtró y cargó por separado. Las flechas indican las proteínas recuperadas de las columnas. Los marcadores de peso molecular están indicados a la izquierda. Los números indican la fracción.

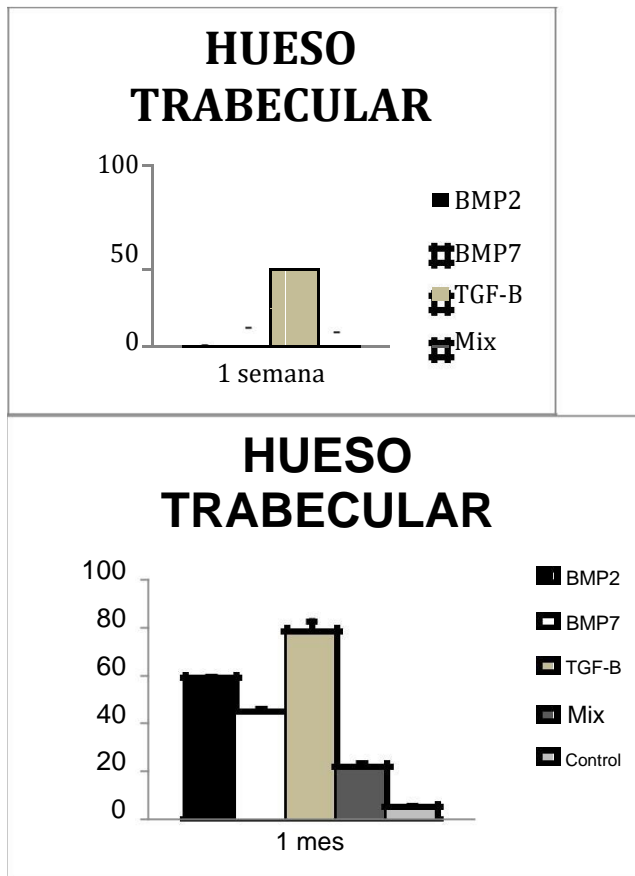


Fig.9 Determinación del porcentaje de tejido óseo por medio de morfometría automatizada después de 1 y 4 semanas de realizados los implantes adicionando los factores de crecimiento indicados. Los resultados se presentan como medias y las desviaciones estándar de tres perros diferentes en los tiempos indicados. TGF- β 1 fue el factor mas eficiente en la inducción de formación hueso. Mix corresponde a los implantes con los tres factores de crecimiento en las mismas concentraciones.

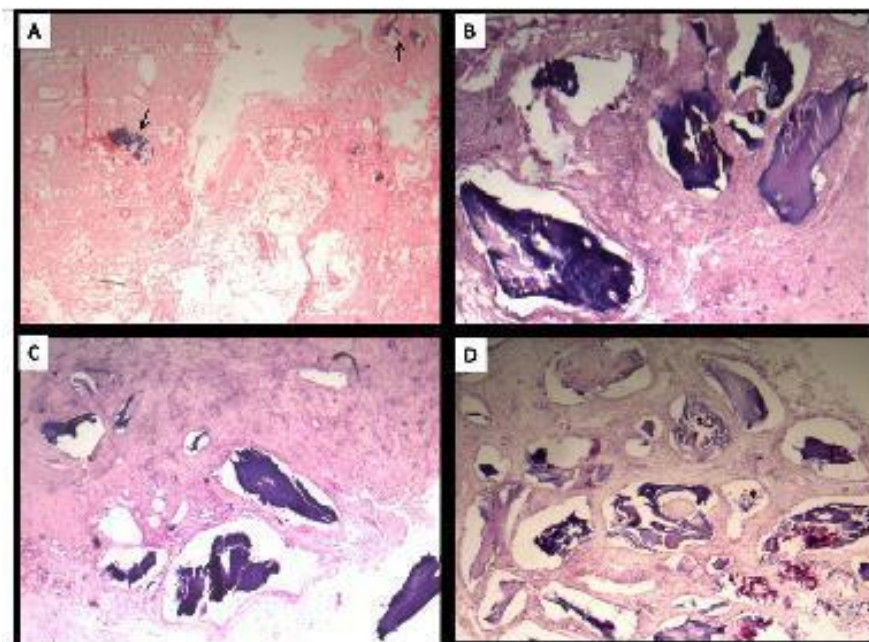


Fig.10 Histologías representativas de los implantes abdominales después de 4 semanas de la cirugía en perros. A) Implante control sin factores adicionados, se encuentra constituido esencialmente de tejido fibroadiposo con pequeñas áreas de hueso (flechas). B) En contraste, implante con BMP-2 recombinante, muestra una gran trabécula de hueso maduro rodeada por tejido fibroso. C) Se observa una producción de hueso similar en el implante con BMP-7. D) Implante con TGF- β 1 muestra la mayor cantidad de hueso producido. (Todas las micro fotografías con aumento 25x, y teñidas con hematoxilina-eosina).

VIII Discusión.

Trauma, osteomielitis, resecciones de tumores óseos y el tratamiento de deformidades congénitas son las principales causas de deficiencia de hueso (45). En estas situaciones complicadas, los injertos autólogos con procuración de hueso en sitios como la cresta iliaca son el tratamiento preferido (45), no obstante, es común que la cantidad de hueso autólogo disponible sea limitado y la procuración dolorosa y con riesgo de infección. Los aloinjertos óseos son alternativa, no obstante, el éxito es limitado debido a desventajas como un tiempo de consolidación retrasado o incorporación incompleta del injerto debido a la respuesta inmune generada. Por estas razones se han investigado y estudiado nuevos abordajes para obtención de hueso tales como la ingeniería

tisular basada en la utilización de factores de crecimiento óseo y células madre (48,49).

Considerando que los sitios intramusculares están bien vascularizados, es esperable que el uso de estos últimos para la inducir la formación ósea es altamente favorable. Lo anterior ha motivado el concepto de prefabricar tejido ósea heterotópico útil en trasplante autólogo (49). En el presente estudio se utilizó una estrategia diferente para la formación de hueso heterotópico, produciendo implantes abdominales constituidos por una esponja de colágeno tipo I adherida con polvo de hueso desmineralizados, plasma rico en plaquetas, trombina y cloruro de calcio, todo lo anterior envuelto en omento (epiplón) el cual es un tejido con una gran vascularidad. Después de 4 meses 50% a 60% del implante total estuvo constituido por hueso maduro trabecular (42). Por lo tanto este es un modelo eficiente para la formación de hueso heterotópico, no obstante se requiere un tiempo considerable para completar el desarrollo. Con la intención de acortar el tiempo de formación ósea, en el presente trabajo, se determinó de manera inicial la cinética de expresión genética de diferentes citocinas osteoinductivas en regiones de tejido seleccionadas dentro de los implantes. Nuestros resultados mostraron que BMP-2, BMP-7 y TGF- β_1 fueron los factores de crecimiento con una expresión más rápida y en mayor cantidad. En una segunda parte de nuestro estudio se produjeron estos factores como proteínas recombinantes en hojas de tabaco y después de su purificación cada una de ellas fue adicionada a los implantes. Después de un mes, los implantes que fueron suplementados con TGF- β_1 tuvieron 80% de hueso maduro trabecular. Por lo anterior, este es un modelo novedoso y eficiente por el cual

en un tiempo relativamente corto se produce hueso heterotópico maduro potencialmente útil para autotransplante.

La inducción de tejido óseo requiere al menos, tres elementos que deben interactuar en un proceso altamente regulado; estos elementos son células ostetoprogenitoras, factores osteoinductivos, y una matriz extracelular de soporte (6, 10,11). Durante los experimentos, los implantes fueron envueltos en epiplón, el cual está constituido por células adiposas blancas, tejido fibroso y una extensa red de vasos sanguíneos. El tejido adiposo es un órgano derivado de mesodermo que tiene una población estromal la cual contiene por igual células endoteliales microvasculares, células de musculo liso y células madre.

A esta última población celular se le denomina células madre derivadas del tejido adiposo, las cuales comparten muchas de las características de su contraparte en la médula ósea incluyendo el potencial de proliferación y la habilidad para diferenciarse en múltiples líneas(50,51). Pero estas células son mucho más numerosas en el tejido adiposo que en la médula ósea (52). Por esto el tejido adiposo del epiplón es una buena fuente de células madre mesenquimales útiles en la formación de hueso heterotópico. Otro factor importante para una producción suficiente de hueso heterotopico es una adecuada irrigación sanguínea (24), y el epiplon tiene una extensa red de vasos sanguíneos que es una buena fuente de nutrientes, oxígeno, y factores de crecimiento angiogénicos, los cuales crean un microambiente adecuado para la inducción de tejido óseo (53,54). Nosotros adicionamos plasma rico en plaquetas a nuestros implantes, debido a que estas células son una fuente importante de factores de crecimiento que favorecen la producción de vasos sanguíneos tales como el VEGF al cual se fija la fibrina y fibrinógeno que por

igual fueron adicionados a esto implantes (55,56). La gran vascularización lograda en nuestros implantes se relacionan con una adecuada respuesta inflamatoria la cual fue un hallazgo histológico constante. Los macrófagos inflamatorios inducen quimiotaxis de células madre mesenquimales y promueven su diferenciación a células óseas a través de la acumulación de factores osteogénicos incluyendo las BMPs (57,58). Lo anterior fue claramente demostrado por nuestro estudio de cinética de expresión genética factores de crecimiento óseo en áreas seleccionadas de los implantes. El tejido inflamatorio (tejido periespicular) mostró la mayor expresión de BMP y TGF- β_1 ...

Un foco importante de la investigación en ingeniería de tejidos ha sido el desarrollo de un transportador ideal de los factores de crecimiento (59). Este transportador debe de actuar como un espacio tridimensional fenestrado a través del cual la formación de hueso nuevo pueda ocurrir y también debe de mantener una concentración umbral efectiva de factores de crecimiento óseo y por igual poseer mecanismos de contención que eviten la formación de hueso en exceso. La colágena se considera un buen transportador debido a que es una buena fuente de moléculas de señalización-adhesión y es también un soporte de vasos sanguíneos y de células del parénquima, así como un material eficiente para concentrar y de proveer de factores de crecimiento que favorezcan la proliferación y diferenciación de las células óseas. Nosotros utilizamos una esponja de colagena tipo I como transportador debido a que es también osteoinductiva y favorece el crecimiento vascular gracias a sus características físicas (60). También existe una buena cantidad de tejido fibroso en el epiplón el cual contribuyo al confinamiento del implante y de los factores de crecimiento, evitando la producción ósea fuera del implante y facilitando su

resección quirúrgica al prevenir la formación de bandas fibróticas y adherencias.

Otro factor biológico esencial que participa en la formación ósea son los factores de crecimiento, tales como BMP, FGF, PDGF, IGF.(60-61) Las BMPs es el subgrupo más grande de factores de crecimiento que pertenecen a la superfamilia de TGF- β_1 , Estos son reguladores pleiotrópicos que median varias respuestas celulares secuenciales tales como: quimiotaxis y proliferación de células progenitoras, diferenciación en osteoblastos, invasión vascular, formación ósea, remodelación y diferenciación de la médula ósea(63-68). BMP también estimula la formación de matriz extracelular (64). En cuanto a formación de hueso se refiere, los factores utilizados con mayor frecuencia son BMP-2 y BMP-7 (también denominada OP-1 proteína osteogénica 1). BMP-2 actúa más como iniciador que BMP-7, favoreciendo la movilización celular global (días 1 a 3), mientras BMP-7 actúa en la diferenciación (días 2 a 5). Estos patrones fueron observados por igual en nuestro modelo. Durante la primera semana de implantación, BMP-2 tuvo una expresión alta particularmente en el tejido inflamatorio periespicular, mientras BMP-7 alcanzó su máxima expresión durante la segunda semana. Debido a estas propiedades mencionadas ambos factores de crecimiento óseo fueron producidos en hojas de tabaco como proteínas recombinantes y se adicionaron a los implantes con la finalidad de acelerar la formación de hueso. En comparación con los implantes control y después de un mes 60% y 45% del implante estuvo constituido por hueso trabecular cuando BMP-2 o BMP-7 fueron adicionados respectivamente. Por lo tanto ambas proteínas recombinantes fueron eficientes para inducir la producción de hueso en mayor cantidad y en menor tiempo en

este modelo de experimental de formación de hueso heterotópico. De manera interesante, ambas proteínas se encuentran disponibles en el escenario clínico y evidencia reciente muestra que las BMPs heterodiméricas pueden tener un mayor efecto que los homodímeros individuales (69). Sin embargo en las condiciones experimentales del presente trabajo, no fue posible observar este efecto sinérgico cuando ambas BMP-2 y BMP-7 se adicionaron en el mismo implante y en la misma cantidad. Variables a estudiar en relación con este fenómeno son: diferentes dosis, proporciones, o el tiempo de administración.

Se requiere mayor investigación que explore este hecho importante, no obstante, nosotros consideramos que la administración de BMP en diferentes dosis y en diferentes tiempos se puede realizar por medio de la inyección de estos factores en el implante, un procedimiento sencillo si se considera que el implante es accesible por debajo de la piel abdominal.

El factor más eficiente para la inducción de formación de hueso en nuestro modelo fue TGF- β_1 . Esta citocina incrementa la formación ósea principalmente reclutando células progenitoras de osteoblastos y estimulando su proliferación, así como promoviendo los estadios iniciales de la diferenciación ósea (70). La apoptosis de osteoblastos es bloqueada por TGF- β_1 (71). Existen variables que afectan el resultado del tratamiento con TGF- β_1 tales como densidad celular, concentración y estadio de diferenciación (70). De hecho la proliferación de osteoblastos, deposición de matriz, y madurez de la colágena se ven disminuidos de manera importante en ausencia de TGF- β_1 . Resultados de tratamiento con TGF- β_1 en especies de *P. Ursinus* han demostrado que bajas dosis del factor en combinación con proteína osteogénica recombinante humana 1 (hOP-1), dan como resultado la inducción de tejido óseo en sitios

heterotópicos (músculo recto del abdomen) tan temprano como 15 días después de la implantación(72). En nuestro modelo, el 80% de los implantes abdominales estuvieron constituidos por hueso trabecular con una sola dosis de TGF- β_1 administrada por separado, lo cual fue significativamente mayor que la cantidad de hueso inducido por BMP-2 o BMP-7. No obstante, existen algunas desventajas potenciales. Primero, TGF- β_1 no sólo modula la formación de hueso sino que también estimula la formación de osteoclastos. Así pues, el tratamiento con TGF- β_1 puede inducir tanto la formación como la resorción ósea, este último efecto puede prevenirse por medio de la administración de este factor exclusivamente durante la implantación temprana. Segundo, la vida media de TGF- β_1 es corta (2 minutos), lo cual implica la necesidad de tener una matriz que permita una lenta liberación, nosotros creemos que la matriz de colágena que fue utilizada en nuestro modelo puede cumplir con esta función, así como un mecanismo de contención que evita otras actividades de TGF- β_1 fuera del ambiente óseo, lo cual previene efectos secundarios.

Aunque BMP- y BMP-7 son agentes osteo inductores potentes, se requieren grandes dosis de estos para producir una respuesta biológica adecuada. De hecho, la concentración de BMPs utilizadas en ensayos clínicos son un millón de veces mayores que aquellas encontradas en el hueso humano (73) y la BMP recombinante es de alto costo. Estos problemas han motivado la implementación de varios abordajes en ingeniería genética para producir BMPs de segunda generación, con mejoría en los perfiles de seguridad y eficacia (74). En este sentido las plantas son una alternativa ideal para la producción de proteínas recombinantes ya que estas se encuentran libres de patógenos mamíferos y las proteínas producidas son idénticas a las proteínas nativas.

Más de trescientas proteínas han sido ya producidas (75). El presente trabajo es el primero en demostrar que los factores de crecimiento recombinante producidos en plantas tales como *N-benthamiana* pueden inducir eficientemente la regeneración ósea *in vivo*. Este sistema fue capaz de producir factores de crecimiento recombinantes en grandes cantidades y bajo costo, y como se demostró en el presente estudio estos factores fueron altamente eficientes para inducir la formación de hueso heterotópico potencialmente útil para autotransplante, constituyendo un ejemplo de medicina translacional.

IX Bibliografía

1. Klerzenbaum A, Tres N. Histology and Cell Biology: an Introduction to Pathology. Cap 5. 2011 Elsevier.
2. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E47-51
3. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 1996; 45: 371–86.
- 4.- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect.* 1996, 45: 387–99.
- 5.-Muschler, G., Nakamoto C., Griffith L Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering *J Bone Joint Surg Am.* 2004 86:1541-1558.
- 6.- Schultz O., Sittinger, M., Haeupl T., Burmester G. Emerging strategies of bone and joint repair. *Arthritis Res* 2000, 2:433–436
7. - Owen, M. The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis Rheum.* 1980, 23: 1074.

9. Buckbinder L, Crawford D, Hong Qi, Hua Zhu Ke, Olson L Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates osteoprogenitor cells and bone formation, and offers an anabolic treatment approach for osteoporosis *Proc Natl Acad Sci.* 2007, 104:10619-10624.
10. Peralta-Zaragoza O., Lagunas-Martinez A., & Madrid-Marina V. Transforming growth factor beta-1: structure, function, and regulation mechanisms in cancer. *Salud Publica Mex.* 2001, 43: 340-351.
11. Massague J., Cheifetz S., Ignatz R. A., & Boyd F. T. Multiple type-beta transforming growth factors and their receptors. *J.Cell Physiol Suppl* 1987 Suppl 5: 43-47.
12. Assoian R. K., Komoriya A., Meyers C. A., Miller D. M., & Sporn M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry* 1983, 258: 7155-7160.
13. Sporn M. B. The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, 17: 3-7.
14. Wharton K. & Derynck R. TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development.* 2009, 136: 3691-3697.
15. Sporn M. B. & Roberts A. B. Transforming growth factor-beta: recent

progress and new challenges. 1992, *J.Cell Biol.* 119: 1017-1021.

16. Sosa M, Macias M. El factor de crecimiento transformante beta (TGF-B): funciones y vías de transducción. *REB.* 2004, 23 (1):3-11

17. Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Mitsock L. M., Whitters M. J., Kriz R. W., Hewick R. M., & Wang E. A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988, 242: 1528-1534.

18. Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004, 15: 1-11.

19. Feng X. H. & Derynck R. Ligand-independent activation of transforming growth factor (TGF) beta signaling pathways by heteromeric cytoplasmic domains of TGF-beta receptors. *Journal of Biological Chemistry.* 1996, 271: 13123-13129.

20. Derynck R., Zhang Y., & Feng X. H. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 1998, 95: 737-740.

21. Wrana J. L., Attisano L., Carcamo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X. F., & Massague J. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992, 71: 1003- 1014.

22. Derynck R. & Zhang Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- beta family signalling. *Nature* 2003, 425: 577-584.

23. Whitman M. Signal transduction. Feedback from inhibitory SMADs. *Nature* 1997,389: 549- 551.
24. Zhang Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009, 19: 128-139.
25. Moustakas A. & Heldin C. H. Non-Smad TGF-beta signals. *J.Cell Sci.* 2005, 118: 3573-3584.
26. Pessah M., Marais J., Prunier C., Ferrand N., Lallemand F., Mauviel A., & Atfi A. c-Jun associates with the oncoprotein Ski and suppresses Smad2 transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277: 29094- 29100.
27. Urist, M.R. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965, **150**: 893
28. Chen D, Zhao M, Mundy G. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* 2004, 22; 4: 233–241
29. Bone morphogenetic proteins: basic concepts Rengachary. *Neurosurg Focus* 2002, 13;6
30. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988, 242: 1528-1534.

31. Groenevald EHJ and Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000, 142: 9-21
32. Varga A, Wrana J. The disparate role of BMP in stem cell biology *Oncogene* 2005, 24: 5713–5721
33. Herpin A, Cunningham C. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *FEBS Journal* 2007, 274: 2977–2985
34. Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C et al. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* 2001, 29: 323-330.
35. Cheng H, Jiang W, Phillips F, Haydon R, Peng Y. Osteogenic Activity of the Fourteen Types of Human Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). *JBJS* 2003, 85-A ;8
36. Heliotis M, Ripamonti U, Ferretti C, Kerawala C. The basic science of bone induction. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009, 47: 511-514
37. Ripamonti U, Tsiridis E, Ferretti C, Kerawala C, Mantalaris A Perspectives in regenerative medicine and tissue engineering of bone *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2011, 49: 507–509

38. Ripamonti U, Ferretti C, Teare J, Blann L. Transforming growth factor-beta isoforms and the induction of bone formation: implications for reconstructive craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 2009, 20:1544–55.
39. Ripamonti U, Duneas N, van den Heever B, Bosh C, Crooks J. Recombinant transforming growth factor-1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner Res* 1997,12:1584–95.
40. Ripamonti U, Ramoshebi LN, Matsaba T, Tasker J, Crooks J, Teare J. Bone induction by BMPs/OPs and related family members in primates. *J Bone Joint Surg* 2001,83A(Suppl. 1):S116–27
41. Manolis H, Ripamonti U, Ferretti C, Kerawala C, Mantalaris A, Tsiridis E The basic science of bone induction. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009, 47: 511–514
- 42.-Ascencio D, Hernández Pando R, Barrios JP, Ridaura SC, Lopez Corella E, Carrasco D, Frenck S. Experimental induction of heterotopic bone in abdominal implants. *Wound Repair and Regeneration* 2004, 12: 643-649.

43. Cooper C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. *Am J Med.* 1997;103:12S-17S; discussion 17S-19S
- 44.-Brixner, D: Assessment of the Prevalence and Costs of Osteoporosis Treatment Options in a Real-world Setting *Am J Manag Care.* 2006;12:S191-S198)
45. Obert L, Deschaseaux F, Garbuio P . Critical analysis and efficacy of BMPs in long bones non-union. *Injury Int J Care Injured* 2005; 365: 538-542
- 46.- Jacquet R, Hillyer J, Landis WJ. Analysis of connective tissue by laser capture microdissection and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2005; 337: 22-34.
- 47.- Lindeman N, Waltregny D, Signoretti S, Loda M. Gene transcript quantitation by real time RT-PCR in cells selected by immunohistochemistry-Laser capture microdissection. *Diagnostic Molecular Pathology* 2002, 11:187-202.
48. - Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol* 2005; 23:718.

49.- Heliotis, M., Lavery, K.M., Ripamonti, U., Tsiroidis, E., di Silvio, L. Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;**35**: 265.

50.-Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz H.P., Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;**7**: 211

51. De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Dragoo, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., Hedrick, M.H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;**174**: 101

52.- Strem B.M, Hicok K.C, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber R.E, Fraser KJ. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005;**54**(3):132-41

53.- Moore, M.A.S. Putting the neo into neoangiogenesis. *J Clin Invest* 2002;
109: 313

54.- Glowacki, J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop* 1998;**355** (Suppl):S82

55.-Sahni, A., Francis, C,W. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 2009;**96**:3772

56.- Tayapongsak, P., O'Brien, D.A., Monteiro, C.B., Arceo-Diaz, L.L. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:161

57.- De Bruijn, J.D., Yuan, H., Dekker, R., Layrolle, P., de Groot, K., van Blitterswijk, C.A. Osteoinductive biomimetic calcium-phosphate coatings and their potential use as tissue-engineering scaffolds. In: *Bone Engineering* (Davies JE, ed), Em squared, Toronto, Canada 421, 2000.

58.- Kan, L., Liu, Y., McGuire, T.L., Berger, D.M., Awatramani, R.B., Dymecki, S.M., Kessler, J.A. Dysregulation of local stem/progenitor cells as a common cellular mechanism for heterotopic ossification. *Stem Cells* 2009; 27:150

59.-Samartzis, D., Khanna, N., Shen, H.F., An, H.S. Update on bone morphogenetic proteins and their application in spine surgery. *J Am Coll Surg* 2005; 200: 236

60.- Reddi, A.H. Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside. *Biochem SocTrans* 2000;28: 345

61.-Fakhry, A., Ratisoontorn, C., Vedhachalam, C, et al. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone* 2005;36: 254

62.-Canalis, E. Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest* 1980; 66: 709

63.-Bax, B.E., Wozney, J.M., Ashhurst, D.E. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* 1999;65: 83

64.-Vaibhav, B., Nilesh, P., Vikram, S., Anshul, C. Bone morphogenic protein and its application in trauma cases: a current update. *Injury* 2007; 38:1227-35

65.- Nishida, Y., Knudson, C.B., Eger, W., Kuettner, K.E., Knudson, W. Osteogenic protein 1 simulates cell associated matrix assembly by normal human articular chondrocytes up regulation of hyaluronan synthase, C.D. 44

and aggrecan. *Arthritid Rheum* 2000; 43:206

66.- Nishida, Y., Knudson, C.B., Kuettner, K.E., Knudson, W. Osteogenic protein 1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures. *Osteoarthritis Cartilage* 2000, 8:127

67. - Reddi, A.H. Morphogenetic messages are in extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside. *Biochem Soc Trans* 2000; 25:345

68.-. Reddi, A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998;16: 247

69. - Zhu, W., Rawlins, B.A., Boachie-Adjei O. Combined bone Morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* 2004;19: 2021

70. - Janssens, K., ten Dijke, P., J a n s s e n s , S., Van Hul, W. Transforming Growth Factor- β 1 to the Bone 2000;26: 743

71.-Karsdal, M.A., Larsen, L., Engsig, M.T., Lou, H., Ferreras., M, Lochte., Delaisse, J.M, Foged NT. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor- β controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. J Biol Chem 2000; 277: 44061

72.- O’Kane, S., Ferguson, M.W. Transforming growth factor β ’s and wound healing. Int. J. Biochem Cell Biol 1997; 29:63

73.-Baltzer, A.W., Lieberman, J.R. Regional gene therapy to enhance bone repair. Gene Ther 2004; 11: 344-50.

74.- Moulay, Hicham, Alaoui-Ismaili., D., Falb. Design of second generation therapeutic recombinant bone morphogenetic proteins. Cytokine & Growth Fact Rev 2009; 20:51

75.- Gomez Lim, MA. Plants as platform for production of pharmaceutical compounds. In: Liong MT. editor. Bioprocess Sciences and Technology. New York: Nova Science Publishers, 295, 2011

RESEARCH

Open Access

Induction of bone formation in abdominal implants constituted by collagen sponges embedded with plant-based human transforming growth factor family proteins in ectopic dog model

Juan Carlos Jacinto-Tinajero¹, Daniel Ascencio², Brenda Marquina¹, Jorge Barrios-Payán¹, Maria Concepcion Gutierrez³, Miguel Gomez Lim⁴ and Rogelio Hernández Pando^{1,5*}

Abstract

Background: Trauma, osteomyelitis, bone tumour resections and congenital deformities are the main causes of bone deficiency in which autologous graft is the preferred treatment, but usually the bone supplies are limited.

Methods: An experimental model of heterotopic bone formation in the subcutaneous abdominal area of dogs was developed. This model consists in omentum wrapped implants constituted by collagen type 1 sponges embedded with demineralized bone powder, calcium chloride, thrombin and platelet rich plasma; the implant is totally converted in trabecular bone after four months of implantation. This model was improved by accelerating bone production, after the isolation of the most conspicuous histological constituents (inflammatory, bone and adipose tissues) by laser microdissection and purified from them RNA that was used to determine by RT-PCR the gene expression kinetics of the most important growth bone factors. Then, the most abundant and rapidly synthesized factors were produced by genetic engineering in tobacco plants.

Results: Bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor- β 1 were the most rapidly and highly synthesized factors, and they were efficiently produced in a genetic engineering plant based system in tobacco leaves. Their incorporation as recombinant proteins in the scaffold collagen sponge induced in just one month mature heterotopic bone.

Conclusion: This study demonstrates for the first time that this plant system is able to produce recombinant bone growth factors in high amount and at low cost, and they were highly efficient to rapidly induce bone formation in abdominal implants potentially useful for autotransplantation.

Keywords: Heterotopic bone; Tissue engineering; Bone morphogenetic proteins

Background

There are several problems that cause bone defects; the most important are trauma, osteomyelitis, bone tumour resections and development deformities [1]. In cases in which bone reconstruction is associated with bone defect, the traditional therapies are usually not successful

and some cases require amputation [2]. Due to these problems the treatment of bone defect has been recently studied, being vascularized bone grafting and distraction osteogenesis the election therapies [3]. Another new perspective in the treatment of this problem is tissue engineering.

Bone tissue engineering is based in part of tissue induction, that can be defined as a process in which a tissue or product derived from it causes a second undifferentiated tissue to differentiate into bone. This process is orchestrated by signaling molecules that govern cell proliferation, migration, and differentiation, which depend on the

* Correspondence: rhdezpando@hotmail.com

¹Experimental Pathology and Surgery Departments, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubiran", Mexico city, Mexico ⁵Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubiran", Section of Experimental Pathology, Mexico city, DF 14000, Mexico
Full list of author information is available at the end of the article



microenvironment and recruitment of progenitor cells, recapitulating embryonic development [4]. Indeed, this process is similar to heterotopic bone formation [5] which usually starts with the proliferation of mesenchymal and perivascular undifferentiated cells, followed by their osteoblastic cell differentiation producing mature bone tissue. Thus, bone induction requires at least of three elements: osteoprogenitor cells, osteoinductive factors and supporting extracellular matrix [6,7]. We developed an experimental model of heterotopic bone formation by the integration of these three elements in the subcutaneous abdominal area of dogs [8]. This model consist in omentum wrapped implants constituted by collagen type I sponges, which is the supportive matrix that have the osteo-inductive factors bone morphogenetic proteins (BMP); platelets rich plasma that is another source of BMP and other growth factors such as transforming growth factor beta I (TGF β 1), platelet derived growth factor (PDGF) and insulin like growth factor I and II (IGF). We also added to the implants thrombin that induces the production of fibrinogen and fibrin which are also osteo-inductive factors and promote vascular proliferation after binding vascular endothelial growth factor (VEGF); moreover, both proteins give a soft consistency and moldable condition permitting to give the implant the desired shape and size that is maintained by the neoformed bone. Although this is an efficient model of heterotopic bone formation, it needs a long time for complete bone formation (four months). The aim of the present work was to accelerate a more efficient bone production in this model. In order to do this, we first isolated using laser microdissection the most conspicuous histological constituents and purified from them total RNA, that was used to determine by RT-PCR the gene expression kinetics of the most important growth bone factors. In a second part of the study, the most abundant and early expressed growth factors (BMP-2, BMP-7, TGF- β 1) were produced in *Nicotiana benthamiana* as recombinant proteins and added to the implants. We decided to use plants for expressing these factors because plants do not contain animal pathogens, have low production costs and rapid production of recombinant proteins is easily performed [9,10]. We used a transient expression system which does not result in transgenic plants. Our results showed a much more rapid production of heterotopic bone (1 month), which could be useful for auto-transplantation.

Methods

Experimental model of heterotopic bone formation

Fourteen mongrel dogs, 4–6 months old and weighing 15–20 kg, free of evident infectious or parasitic illnesses, were anesthetized with pentobarbital (16 mg/kg) and atropine (0.5 mg/kg). Anesthesia was maintained with 2% Ethrane (enflurane). An abdominal midline incision was performed

and the great omentum was dissected tailoring a flap with a pedicle from the right gastro-omental artery, keeping the omentum flap immersed in the subcutaneous tissue. The implant was constituted by a sponge of type I collagen and polyvinylpyrrolidone (Fibroquel; Aspid Laboratory, Mexico), embedded with 5 ml of demineralized bone powder (DBP) (Veterinary Trans-plant Services, Seattle, WA), 5 ml of dog platelet-rich plasma, 10,000 IU of bovine thrombin (Behring, Mexico), and 2.5 ml of 10% calcium chloride (14.7 mg). The mixture of platelet-rich plasma, DBP, thrombin, and collagen formed a soft material that after 1 or 2 minutes was easily moldable and allowed the formation of a cylinder that was wrapped with the omentum flap. Animals were maintained in conventional room with food and water ad libitum. This protocol was approved by the Animal Research and Ethics Committees of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition, according to Mexican and International laws.

Kinetics of growth factors genetic expression from specific histologic compartments

The mosaic expression of growth factors during skeletogenesis indicates that diverse bones have different expression of them and it should have therapeutic significance [5]. We hypothesized that a similar situation should exist during heterotopic bone formation. Thus, abdominal implants were dissected and removed after 7, 14, 28, 60, 90, and 120 days of their implantation. Each implant was divided into quadrants and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde diluted in phosphate buffered saline solution. After 3 days of decalcification with formic acid, the tissue was embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. At least two sections were obtained from each quadrant. In these slides, the most conspicuous tissues were the connective-inflammatory tissue, adipose tissue, and osteoid or mature bone trabeculae. We laser captured these areas by separate under direct microscopic visualization by melting of the selected regions onto a thermoplastic film mounted on optically transparent LCM caps using the Arcturus XP equipment (Arcturus Engineering, Mountain View, CA, USA). The thermoplastic film containing the microdissected tissue cells was used to isolate total RNA using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Quality and quantity of RNA were evaluated through spectrophotometry (260/280 nm) on agarose gels. Reverse transcription of the mRNA was performed using 5 μ g RNA, oligo-dT and the Omniscript kit (Qiagen). Real-time PCR was performed using the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and Quantitect SYBR Green Master-mix kit (Qiagen). Standard curves of quantified and diluted PCR product, as well as negative controls, were included in each PCR run. Specific primers

were designed using the program Primer Express (Applied Biosystems) for the following targets: TGF- β 1 F: ATG TCA CTG GAG TCG TGA GGC. TGF- β 1 R: CCT CGA CTT CCC CTC CAT G. BMP 2 F: AGC CTG GCC AAC ACC GT. BMP 2 R: CAA AGA TTC TAA TTC TTC GT. BMP 6 F: GCG CCT CAG CCC CAA. BMP 6 R: AGG AGT TCT TCC TCT CTC TA. BMP 7 F: GCA GGA CTT GAT CAT CGC TC. BMP 7 R: CCC TCA CAG TAG TAA GCG CGA. IGF 1 F: CAA TTG CTG TTG GGT CGT CA. IGF 1 R: CGC TGA ACA GGG CTT CTG TA. IGF 2 F: GGA CAG CCT GCT TGC TCA AT. IGF 2 R: TTC ACT TGC TCG CAG TTT TCC HPRT F: GGA CAG TAG GAC TGA GCG GCT. HPRT R: CTA CGA TGT GAT GGC CTC CC.

Production of recombinant growth factors in *Nicotiana benthamiana*

As shown below our study of gene expression kinetics of growth factors showed that BMP-2 was the most rapid and highest expressed factor, followed by BMP-7 and TGF- β 1. Thus, we produced these as recombinant proteins in plants.

The sequences employed (TGF β 1 GenBank: X02812.1 TGF β 1, BMP2 NM_001200.2, BMP7 NM_001719.2) were optimized for expression in plants and synthesized by Genscript.com for cloning. All sequences contained a 6xHis tag at the 3'end and were flanked with BsaI sites and cloned in the pICH31070 vector. Orientation and codon in-frame for all constructs were confirmed by restriction analysis and sequencing. All expression vectors were kindly provided by Dr. Yuri Gleba (Icon Genetics)

[11]. The expression vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 by electroporation. The infiltration of *Agrobacterium* into *N. benthamiana* plants was performed as described [12]. In brief, *Agrobacterium* overnight cultures were grown in YENB medium to high cell density (OD₆₀₀ = 0.6) and were diluted into infiltration buffer (10 mM MES, pH 5.5; 10 mM MgSO₄) to reach the desired concentration. Bacterial suspensions were infiltrated into plants leaves using vacuum. After infiltration, the plants were grown under glasshouse conditions for 10 days. Leaves were then harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at 80°C. Subsequently they were macerated and resuspended in extraction buffer (10 mM PBS pH 7.4, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA pH 8.0, 0.01% Triton X-100, 50 mM sodium ascorbate, 100 mM PMSF, 100 mM DTT) at 1:2 (v/w) ratio and centrifuged (8000 × g) for 20 min at 4°C. The supernatant was retained and the concentration of total soluble protein (TSP) was determined by the Bradford method (Bio-Rad) with BSA as standard. For purification of the growth factors, the extracts were loaded on a HisTrap HP column (GE Healthcare Life Sciences), the column washed and the 6xHis tag-containing proteins eluted as described by the

manufacturers. Fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE. Those fractions showing the factors in the purest form were pooled and stored. The identity of each factor was confirmed by western-blot. Briefly, equal amounts of protein from each factor were separated on a non-reducing 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and blocked with 5% fat free milk in TBS/ 0.05% Tween 20 for 2 h. The membrane was incubated with anti-TGF β 1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-BMP-2 or BMP-7 (Peprotech) polyclonal rabbit antibodies at 4°C overnight. After washing, the membrane was incubated with HRP-conjugated anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology) in Tris-Tween 20 for 1 h. Following several washes, the blot was developed by chemiluminescence (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Control blots were processed without incubation of the primary Ab.

Effect of recombinant BMP2, BMP7 and TGF β 1 in the heterotopic bone production in abdominal implants

In two independent experiments, eight mongrel dogs were used for the evaluation of heterotopic bone formation in implants with recombinant growth factors. Following the same procedure described above, in the right side were made two implants, in the upper implant was added 2 cc (200 mg) of recombinant BMP-2, in the lower implant was added the same amount of BMP-7, while in the left side three implants were produced, in the top implant was added the same concentration of TGF- β 1, in the middle implant was added the three growth factors in the same doses and the bottom implant was the control without recombinant factors. Right and left implants were removed after 1 and 4 weeks and evaluated histologically for bone formation in sections stained with hematoxylin and eosin. The percentage of the tissue implant conformed by trabecular bone was determined by automated morphometry. Other sections were stained with Masson trichrome and von Kossa techniques in order to evaluate bone maturation. Cellular proliferation was evaluated by the detection of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) using conventional immunohistochemistry [8].

Statistical analysis

Student's T-test was used to determine statistical significance of bone growth factors expression and histomorphometry. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Gene expression kinetics of growth factors during heterotopic bone formation

Figure 1 shows that at 7 days of implantation, BMP-2 was the highest expressed factor in the connective inflammatory tissue around or distant from small areas of

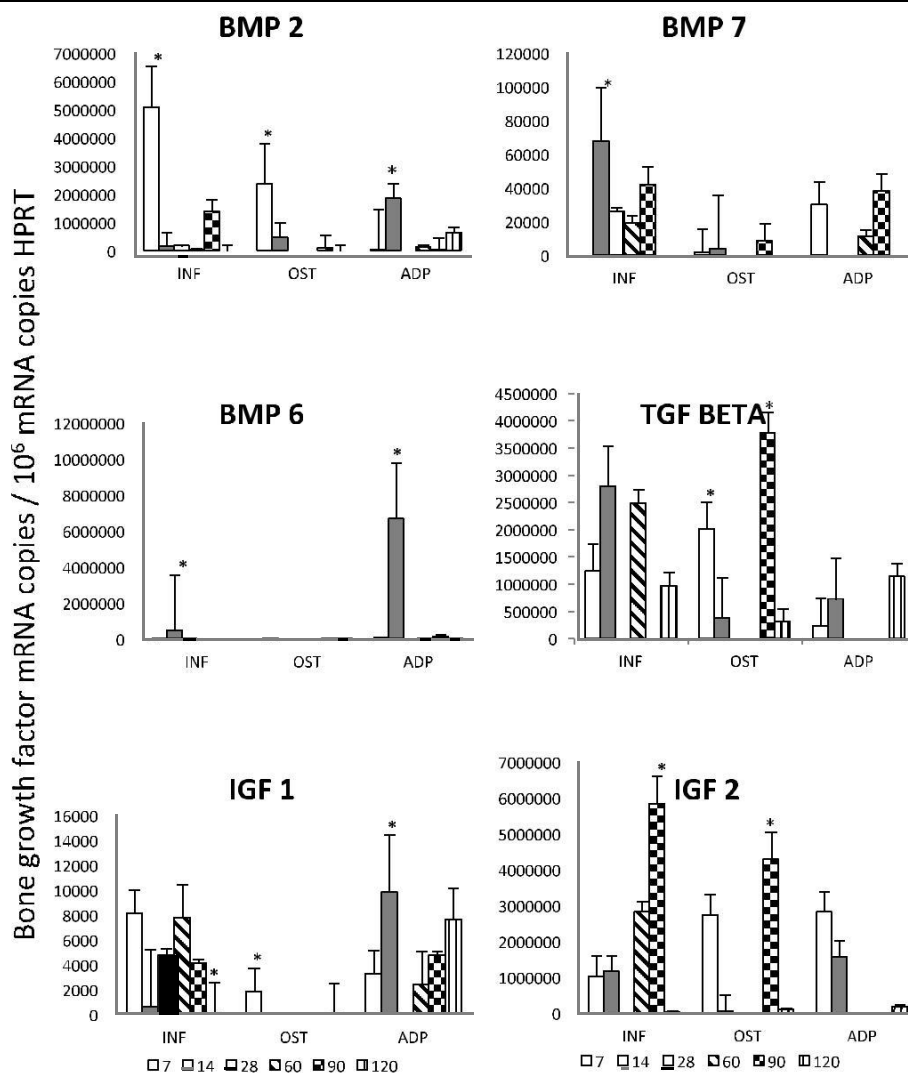


Figure 1 Kinetics of bone growth factors gene expression during heterotopic bone formation. Bone trabeculae (OST), inflammatory tissue (INF) and adipose tissue (ADP) were isolated from the implants using laser microdissection and used to isolate total RNA to determine by RT-PCR the indicated bone growth factor during the heterotopic bone formation. Numbers indicate the day when the implant was obtained after the implantation. Results are present as mean and standard deviation from three dogs in the indicated time points. Two independent experiments were run with similar results. Asterisks represent statistical significance comparing the groups in each time point ($p < 0.05$).

immature bone, in which also was determined a high expression of this growth factor, while in the adipose tissue the expression of BMP-2 raised its peak after two weeks of implantation being the number of transcripts similar than in the osteoid after one week of implantation. Then, the expression of BMP-2 progressively declined in the three different tissues. TGF- β 1 was also highly expressed after one week of implantation in immature bone, and this expression was twofold higher after two months when well formed trabecular bone was already produced, while in the connective tissue around bone trabeculae the peak of TGF- β expression was after 2 and 4 weeks of implantation and similarly expressed after 4 months in the three different tissues (Figure 1).

The kinetics of BMP-7 expression was different; this factor showed its highest expression after 2 weeks of implantation in the inflammatory cells located around or distant to bone trabeculae, followed by temporal decrease and increasing again after 60 days showing similar level of expression in the adipose tissue, while a mild and stable expression was detected in the trabecular bone. In contrast, BMP-6 was only expressed after one week of implantation in the inflammatory and adipose tissue (Figure 1). IGF-2 exhibited its highest level after 3 months of implantation in the inflammatory and bone tissue, while in the adipose tissue it raised its peak after one week of implantation. In contrast, IGF-1 exhibited a lower and constant expression (Figure 1).

Production of recombinant BMP-2, BMP-7 and TGF- β 1 in tobacco and their effect in heterotopic bone formation BMP-2, BMP-7 and TGF- β 1 were successfully produced in tobacco leaves and their molecular identity was confirmed by western-blotting (Figure 2). After purification, the same amount of each growth factor was added to the implants and the bone production was evaluated after 1 and 4 weeks. All animals survived the surgical procedure. Neither infection nor significant local inflammation was seen. During the surgical resection, the implants showed excellent vascularization without excessive adherences, allowing for an easy surgical extraction and maintained their cylindrical shape. Control implants that did not have the recombinant proteins showed scarce bone formation, less than 5% after one month of implantation (Figures 3 and 4). In contrast, the implants that had recombinant growth factors showed trabecular mature bone since the first week of implantation, being 3%, 12% and 40% in implants with recombinant BMP-2, BMP-7 and TGF- β 1 respectively. The percentage of bone formation progressively increased, being more than 80% after one month of implantation with TGF- β 1, followed by 60% and 45% in the implants with BMP-2 and BMP-7 respectively. Both factors induced the nuclear expression of PCNA in the mesenchymal cells around the bone trabeculae, and particularly BMP7 induced relatively large areas of osteoid material (Figure 4). Thus, cellular proliferation and differentiation are involved in heterotopic bone production. The addition of the three growth factors in the same implant showed lesser production of heterotopic bone than the implants that received each factor independently, histologically this implants showed numerous small blood vessels and osteoid. This efficient and relatively rapid bone production confirms the effective biological efficiency of these factors produced in plants.

Discussion

The preferred treatment of bone deficiency is autologous graft with bone harvested from sites such as the iliac crest [13], but usually the available autologous bone supplies are limited and harvesting is painful and with risk

of infection. Bone allograft is an alternative, but it has limited success because the delayed time to fusion or incomplete graft incorporation due to the elicited immune response [14]. Thus, several novel approaches are currently being explored, such as tissue engineering [7].

Well-vascularised intramuscular sites are highly favorable to the induction of bone formation and this has motivated the manufacturing of heterotopic bone for autologous transplantation [15]. We used another strategy for heterotopic bone formation, producing abdominal implants constituted by a type I collagen sponge embedded with DBP, platelets and calcium chloride wrapped with omentum [8]. We now improved this system by the addition of recombinant BMP-2, BMP-7 or TGF- β 1 which were the quickest and highest bone growth factors produced in this model.

The induction of bone tissue requires osteoprogenitor cells, osteoinductive factors and a supporting extracellular matrix that must interact in a highly regulated process [5-7]. We wrapped the implants with omentum, which is constituted by adipose cells, fibrous tissue and a blood vessels network. Adipose tissue is a mesodermally derived organ that has a stromal population containing endothelial, smooth muscle and stem cells [16]. Adipose tissue-derived stem cells share many characteristics of its counterpart in bone marrow including multilineage differentiation [17]. Thus, the omentum adipose tissue is a good source of mesenchymal stem cells for heterotopic bone formation.

Adequate vascularization is another important attribute for heterotopic bone production [18], and the omentum has an extensive blood vessels network that is a good source of nutrients, oxygen, and growth factors, creating a proper microenvironment for bone induction. We added platelet rich plasma to our implants because these cells are a source of growth factors that induce blood vessels production [19]. High vascularization is also related with an adequate inflammatory response with numerous macrophages that induce chemotaxis of mesenchymal stem cells and promote their differentiation to bone cells through production of osteogenic

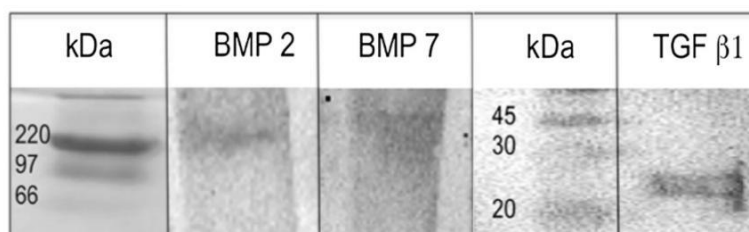
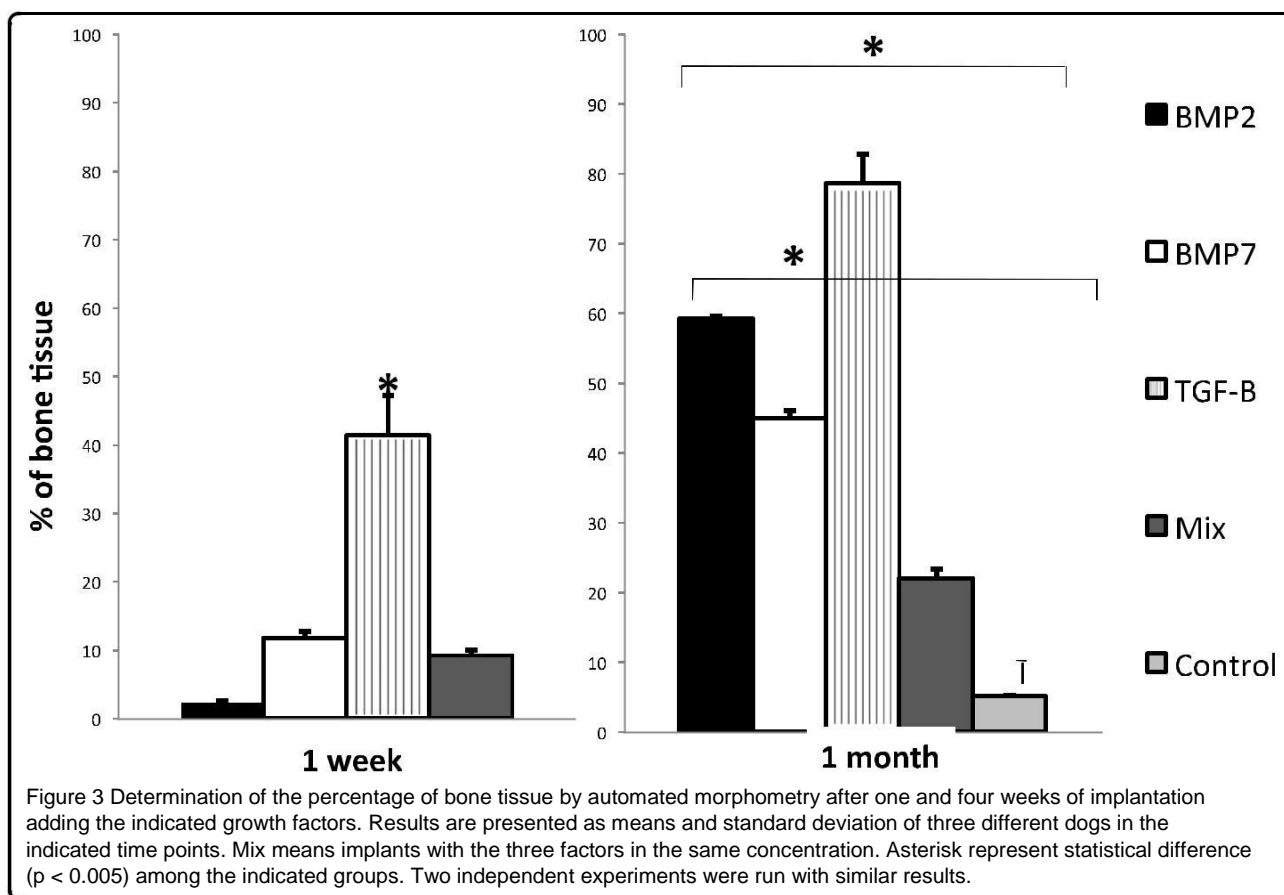


Figure 2 Identification by western-blot of recombinant BMP-2, BMP-7 and TGF- β 1 from *Nicotiana benthamiana* leaves. Crude extracts from plants containing each factor and obtained as described in the text were filtered on 0.2 μ m membranes and loaded on a HisTrap HP column. Each factor was loaded separately. Fractions were dialyzed against PBS, loaded on a SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with specific rabbit polyclonal antibodies to confirm its identity. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left.



factors [8]. This was clearly demonstrated by our gene expression kinetics study which showed the inflammatory tissue as the site of the highest expression of BMP and TGF- β 1.

A significant focus of research on tissue engineering has been the developing of ideal carriers for bone growth factors [20]. The carrier should act as three-dimensional space scaffolding across which de novo bone formation can occur; and also should maintain an effective concentration of growth factors and containing them in order to avoid extraneous bone formation. Collagen is considered a good carrier, because it is a good source of adhesion-signaling molecules and is also a support for blood vessels and parenchymal cells. We used a type I collagen sponge as carrier, because it is also osteoinductive and favored vas-cular growth due to its physical characteristics. There is also a good amount of fibrous tissue in the omentum, which contributed to the confinement of the implant and growth factors, avoiding the bone production outside the implant and facilitates its surgical resection avoiding the formation of adherences.

Other essential elements in bone formation are specific growth factors, such as BMP, FGF, PDGF, IGFs [21,22]. BMP is the largest sub group of growth factors that belong to the TGF- β superfamily; they are pleiotropic regulators

that mediate various sequential cellular responses such as: chemotaxis and proliferation of progenitor cells, differentiation into osteoblast, vascular invasion, bone formation, remodeling and bone marrow differentiation [6,21]. For bone induction, the most commonly utilized BMPs are BMP2 and 7. BMP2 acts upstream inducing global cellular mobilization (day 1 to 3), whereas BMP7 acts on bone dif-ferentiation (day 2 to 5) [2]. These kinetics patterns were also observed in our model, during the first week of im-plantation BMP2 was highly expressed, while BMP7 raised its maximal expression during the second week. We pro-duced both factors in tobacco leaves as recombinant pro-teins and added into the implants. After one month, 60% and 45% of the implant was constituted by trabecular bone when added BMP-2 or BMP-7 respectively. The in-duction of cell proliferation by both BMPs was demon-strated by the immunohistochemistry detection of the cell proliferation marker PCNA, which showed numerous positive cells in the mesenchymal tissue around bone tra-beculae. Thus both recombinant proteins are efficient in-ducing a more rapid bone production in this model. Indeed, both BMPs are now available in the clinical setting [2], and recent evidence has shown that heterodimeric BMPs may have a greater effect than homodimers alone [23]. However in our experimental conditions, we did not

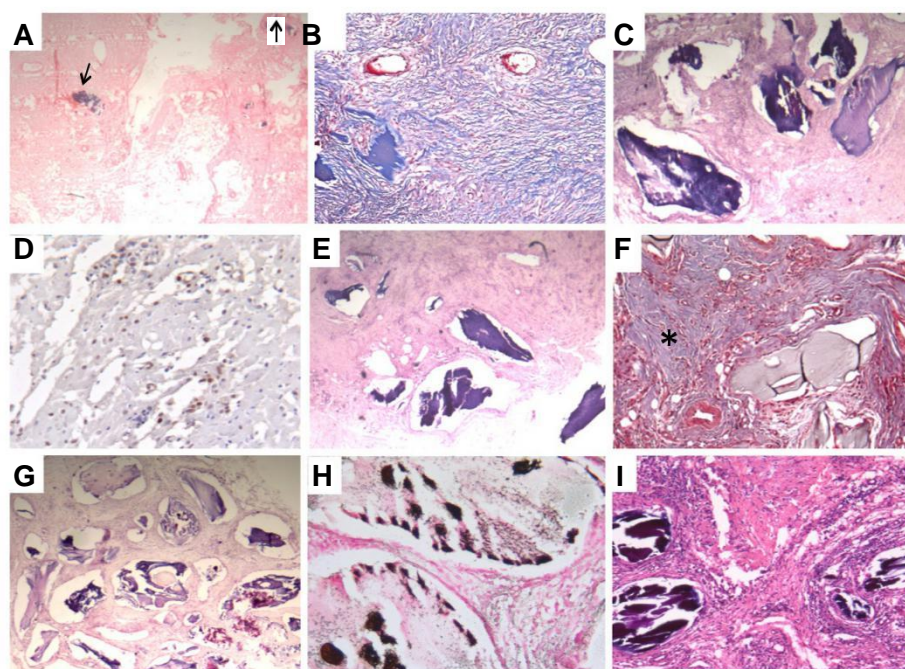


Figure 4 Representative histology of implants after 4 weeks of abdominal implantation. A) Control implant without any factor is essentially constituted of fibroadipose tissue with small areas of bone (arrows). B) Fibrous tissue in control implant is well demonstrated by Masson trichromic staining. C) In contrast, implant with recombinant BMP-2 shows large mature bone trabeculae surrounded by fibrous or mesenchymal tissue. D) This mesenchymal tissue shows numerous cells with PCNA positive immunostaining. E) Similar bone production is observed in implant with BMP-7. F) This implant with BMP7 shows extensive areas of osteoid in section stained with Masson technique (asterisk). G) Even more bone trabeculae are seen in an implant with addition of TGF-1. H) They are mature trabeculae constituted by well calcified bone as show by Von Kossa staining. I) In comparison, fewer bone trabeculae were induced in implant with all the TGF family factors.

observe this better effect when both factors were added in the same implant at the same amount; perhaps because the dose, proportions and the timing for their administration. More investigation should be done exploring this important issue, which we consider an easy procedure considering that the implant is below the abdominal skin facilitating the direct BMP administration by injection.

The most efficient factor to induce bone formation in our model was TGF- β 1. This cytokine increases bone formation mainly by recruiting osteoblast progenitors and stimulating their proliferation, as well as by promoting the early stages of bone differentiation [24]. Results from *P. ursinus* have shown that low doses of TGF- β 1 combined with recombinant human osteogenic protein-1 result in the induction of massive ossicles in heterotopic sites (rectus abdominis muscle) as early as 15 days [25]. In our model, 80% of the abdominal implants were constituted by trabecular bone with only one dose of TGF- β 1 administered alone. However, there are some potential disadvantages of this procedure. First, TGF- β 1 not only modulates bone formation but can also stimulate osteoclast formation, which can be prevented by its administration during early implantation. Second, the half-life of TGF- β 1 is short (2 min), implying the need for a matrix to allow for its slow release, we believe that

collagen matrix can do this function, as well as containing it avoiding other activities of TGF- β outside the bone.

Although both BMP-2 and BMP-7 are potent osteoinductive agents, very large doses are required to produce an adequate biologic response. Indeed, the concentration of BMPs used in clinical trials are more than one million times greater than that found in human bone [26], and recombinant BMP is quite expensive. In this sense, plants represent an ideal alternative for production of recombinant proteins as they lack mammalian pathogens and the proteins produced are identical to the native ones and highly cost effective [9,10,27].

Conclusion

Implants constituted by collagen type 1 sponge embedded with DBP, calcium chloride, thrombin, platelets and recombinant TGF β 1 wrapped with omentum efficiently induce heterotopic bone formation in the subcutaneous abdominal area in dogs. It was demonstrated for the first time that growth factors produced in plants in high amounts and at low cost were highly efficient to rapidly induce heterotopic bone formation potentially useful for autotransplantation.

Competing interests

Authors declare that there are not competing interests.

Authors' contributions

JCJT carried out the surgical work, tissue laser microdissection and bone growth factor kinetics. AD designed the experimental model of heterotopic bone production. BM supervised and performed the molecular work. JBP carried out the histological work. MCG analyzed and interpreted the results. MGL designed and performed the production of recombinant bone growth factors in plants. RHP designed the improvement of the experimental model, supervised the experimental work and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by the Mexican Council of Science and Technology CONACyT (contract no 2006-C01-45386). JCJT was recipient of a postdoctoral scholarship from CONACyT.

Author details

¹Experimental Pathology and Surgery Departments, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubiran", Mexico city, Mexico.

²Plastic Surgery, Angeles Hospital, Mexico city, Mexico. ³Experimental Biology Department, Metropolitan University, Mexico city, Mexico. ⁴Department of Genetic Engineering in Plants, National Polytechnic Institute Center of Research and Advanced Studies, Irapuato, Mexico. ⁵Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubiran", Section of Experimental Pathology, Mexico city, DF 14000, Mexico.

Received: 5 February 2014 Accepted: 12 June 2014

Published online: 16 July 2014

References

1. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegler ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, Schell H, van Griensven M, Redl H, Hutmacher DW (2009) The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 30:2149e63
2. Obert L, Deschaseaux F, Garbuio P (2005) Critical analysis and efficacy of BMPs in long bones non-union. *Injury Int J Care Injured* 36:538–542
3. Giotakis N, Narayan B, Nayagam S (2007) Distraction osteogenesis and nonunion of the docking site: is there an ideal treatment option? *Injury* 38: S100e7
4. Boden SD (1999) Bioactive factors for bone tissue engineering. *Clin Orthop* 367:S84–S94
5. Ekelund A, Brosjö O, Nilsson O (1991) Experimental induction of heterotopic bone. *Clin Orthop* 263:102–12
6. Urist MR (1965) Bone formation by autoinduction. *Science* 150:893–9
7. Caplan AI, Goldberg VM (1999) Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissue. *Clin Orthop* 367:S12–S16
8. Ascencio D, Hernández Pando R, Berríos JP, Ridaura SC, Lopez Corella E, Carrasco D, Frenck S (2004) Experimental induction of heterotopic bone in abdominal implants. *Wound Repair Regen* 12:643–649
9. Kirk DD, Webb SR (2005) The next 15 years: taking plant-made vaccines beyond proof of concept. *Immunol Cell Biol* 83:248–256
10. Yusibov V, Streatfield SJ, Kushnir N (2011) Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Hum Vaccine* 7:313–21
11. Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2005) Systemic agrobacterium tumefaciens – mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 23(6):718–23
12. Coconi Linares N, Ortega Dávila E, García Machorro J, García Cordero J, Cedillo-Barrón L, Gómez Lim MA (2013) Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 31:2366–2371
13. Lasanianos NG, Kanakaris NK, Giannoudis PV (2009) Current management of long bone defects. *Orthopaedics and Trauma* 24(2):149–162
14. Burchardt H, Enneking W (1978) Transplantation of bone. *Surg Clin North Am* 58:403–427
15. Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U, Tsiroidis E (2006) Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35:265–269
16. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–228
17. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser KJ, Hedrick HM (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132–141
18. Moore MAS (2002) Putting the neo into neoangiogenesis. *J Clin Invest* 109:313–5
19. Sahni A, Francis CW (2000) Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 96:3772–8
20. De Bruijn JD, Yuan H, Dekker R, Layrolle P, de Groot K, van Blitterswijk CA (2000) Osteoinductive biomimetic calcium-phosphate coatings and their potential use as tissue-engineering scaffolds. In: Davies JE (ed) *Bone Engineering*. Em squared, Toronto, Canada, pp 421–431
21. Samartzis D, Khanna N, Shen HF, An HS (2005) Update on bone morphogenetic proteins and their application in Spine surgery. *J Am Coll Surg* 200:236–248
22. Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedhachalam C (2005) Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone* 36:254–66
23. Zhu W, Rawlins BA, Boachie-Adjei O (2004) Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* 19:2021–32
24. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W (2005) Transforming Growth Factor- β 1 to the Bone 26:743–774
25. O'Kane S, Ferguson MW (1997) Transforming growth factor β 's and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 29:63–78
26. Baltzer AW, Lieberman JR (2004) Regional gene therapy to enhance bone repair. *Gene Ther* 11:344e50
27. Gomez Lim MA (2011) Plants as platform for production of pharmaceutical compounds. In: Liong MT (ed) *Bioprocess Sciences and Technology*. Nova Science Publishers, New York, p 295

doi:10.1186/s40634-014-0011-z

Cite this article as: Jacinto-Tinajero et al.: Induction of bone formation in abdominal implants constituted by collagen sponges embedded with plant-based human transforming growth factor family proteins in ectopic dog model. *Journal of Experimental Orthopaedics* 2014 1:11.

Submit your manuscript to a
SpringerOpen journal and benefit
from:

- 7 Convenient online submission
- 7 Rigorous peer review
- 7 Immediate publication on acceptance
- 7 Open access: articles freely available online
- 7 High visibility within the field
- 7 Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at springeropen.com



INGENIERIA TISULAR PARA LA
OBTENCION DE HUESO
HETEROTOPICO UTIL EN
AUTOTRASPLANTE

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 9 del mes de septiembre del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ
DR. JUAN JOSE PLATA MUÑOZ
DRA. AVELINA SOTRES VEGA



JUAN CARLOS JACINTO TINAJERO
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JUAN CARLOS JACINTO TINAJERO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DR. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

VOCAL

DR. JUAN JOSE PLATA MUÑOZ

SECRETARIA

DRA. AVELINA SOTRES VEGA