

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA, SERVICIO
DE ORTODONCIA

TESIS:

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE ANDAMIOS DE CUTÍCULA
DE HUEVO DE GALLINA PARA FUTURA REGENERACIÓN
ÓSEA EN FISURAS NASOALVEOLARES DE PACIENTES CON LABIO
Y PALADAR HENDIDO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

ORTODONCIA

PRESENTA:

C.D. SERGIO LAGARDA PIÑÓN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOAQUÍN CANSECO JIMÉNEZ



CD. DE MÉXICO, MARZO 2019

Resumen

Introducción. El propósito de este estudio fue la caracterización físico-química de andamios de cutícula de huevo de gallina descelularizada para futura regeneración ósea en fisuras nasoalveolares de pacientes con labio y paladar hendido.

Material y métodos. Se incluyeron 33 muestras de cutículas de huevo de gallina con periodos de incubación de 10 y 18 días. El grupo control (A1 y A2) sin tratamiento de descelularización, fue comparado con los grupos (B1-B2, C1-C2, D1-D2 y E) sometidos a tratamiento de descelularización con los distintos protocolos (P1, P2 y P3). A todos los grupos se les realizaron pruebas morfológicas con el microscopio electrónico de barrido (MEB) (JEOL JSM 7600F, USA) para medir el tamaño de los poros, longitud y anchura de las fibras de las cutículas. La extracción de proteínas y ADN se realizaron mediante electroforesis, las pruebas de resistencia a la tracción se realizaron solo a cutículas nativas sin ningún tratamiento, con la máquina universal de pruebas (Instron serie 5567, Bluehill 1, USA), la citotoxicidad se valoró por medio de espectroscopia infrarroja (IF-TR Bruker Tensor 27, USA) a cutículas sometidas al P-3 y se comparó con grupo control.

Resultados y conclusión. Se concluye que el P-1 de descelularización fue el que cumplió con las características adecuadas para la utilización como andamio para la futura regeneración ósea de fisuras nasoalveolares en pacientes con labio y paladar hendido

Palabras clave. Caracterización, Cutícula de huevo, Andamios, Fisura nasoalveolar, Labio y paladar hendido.

Abstract

Introduction. The aim of this research was the physical and chemical characterization of decellularized chicken egg shell membrane scaffolds for future bone regeneration in nasoalveolar clefts of patients with cleft lip and palate.

Material and methods. Thirty-three samples of chicken egg cuticles were included with incubation periods of 10 and 18 days. The control group (A1 and A2) without decellularization treatment was compared with the groups (B1-B2, C1-C2, D1-D2 and E) subjected to decellularization treatment with the different protocols (P1, P2 and P3). All groups were subjected to morphological tests with the scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JSM 7600F, USA) to measure the size of the pores, length and width of the cuticle fibers. The removal of proteins and DNA were made by electrophoresis, the tests of tensile strength were carried out only to native cuticles without any treatment, with the universal testing machine (Instron series 5567, Bluehill 1, USA), the cytotoxicity was assessed with IFTR (IF-TR Bruker Tensor 27, USA) to cuticles subjected to P-3 and compared with control group.

Results and conclusion. It is concluded that the P-1 of decellularization was the one that fulfilled the characteristics suitable for the use as a scaffold for the future bone regeneration of nasoalveolar clefts in patients with cleft lip and palate.

Keywords. Characterization, Egg shell membrane, Scaffold, Nasoalveolar cleft, Cleft lip and palate.

I. Introducción

El propósito de este estudio fue la caracterización físico-química de andamios de cutícula de huevo de gallina descelularizada para futura regeneración ósea en fisuras nasoalveolares de pacientes con labio y paladar hendido. Los términos ingeniería de tejidos y medicina regenerativa se incluyen en la palabra (TERM). Las células son los componentes fundamentales del tejido, y los tejidos son la unidad básica de la función en el cuerpo. Generalmente, grupos de células forman y realizan sus propias estructuras de soporte, llamadas matriz extracelular. Esta matriz, es un andamio que sirve de soporte para las células, también actúa como una estación duplicadora para varias moléculas de señalización. Por consiguiente, las células reciben mensajes de muchas fuentes que se vuelven disponibles desde el entorno local. Cada señal puede iniciar una cadena de respuestas que determinan qué le sucede a la célula. Al entender cómo responden las células individuales a las señales, cómo interactúan con su entorno y cómo se organizan en los tejidos y organismos, se han podido manipular estos procesos para sanar los tejidos dañados o incluso crear nuevos.^{1,2,3}

Experimentalmente y para la aplicación terapéutica, el proceso comienza con la construcción de un andamio a partir de un amplio grupo de fuentes posibles, desde proteínas hasta materiales poliméricos. Una vez que se crean los andamios, se pueden introducir células con o sin un “coctel” de factores de crecimiento. Si el entorno es adecuado, se desarrolla un tejido. En algunos casos, las células, los andamios y los factores de crecimiento se mezclan todos al mismo tiempo, para permitir que el tejido se forme. Este proceso ha sido utilizado para la bioingeniería de tejidos, por ejemplo: de corazón, hígado, pulmón, riñón, entre otros. Este enfoque ofrece grandes esperanzas para utilizar el andamiaje con el tejido humano descartado durante una cirugía y combinarlo con las propias células de un paciente para hacer órganos personalizados que no sean rechazados por el sistema inmunológico.^{1,3}

Estos nuevos productos requieren de la evaluación de la seguridad del producto según las directrices de la Parte 5 de ISO / EN 10993-5, que describe métodos de prueba para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de dispositivos médicos.^{4,5,6}

Es interesante observar que la membrana de cáscara de huevo se ha utilizado como andamio para la regeneración ósea mediante ingeniería de tejidos en diferentes estudios, como el de Pillai y cols. en 2015 con excelentes resultados¹⁷. Esta membrana interna de cutícula de huevo tiene dos capas entre la clara de huevo y la cáscara de huevo. Contiene principalmente proteínas como el colágeno tipo I, V y X, glucosaminoglucanos, glicoproteínas, osteopontina y sialoproteína. Tanto la membrana externa como la interna (figura 1 a y b) están compuestas por fibras de proteínas entreteladas, mientras que la membrana interna es

comparativamente más gruesa y compacta. Esta permite intercambios gaseosos, protege al embrión al igual que la membrana amniótica humana al embrión humano, específicamente desempeña un papel clave en la biomineralización de la cáscara de huevo, que solo toma menos de 24 horas y es el proceso de biomineralización más rápido que se ha conocido.⁷

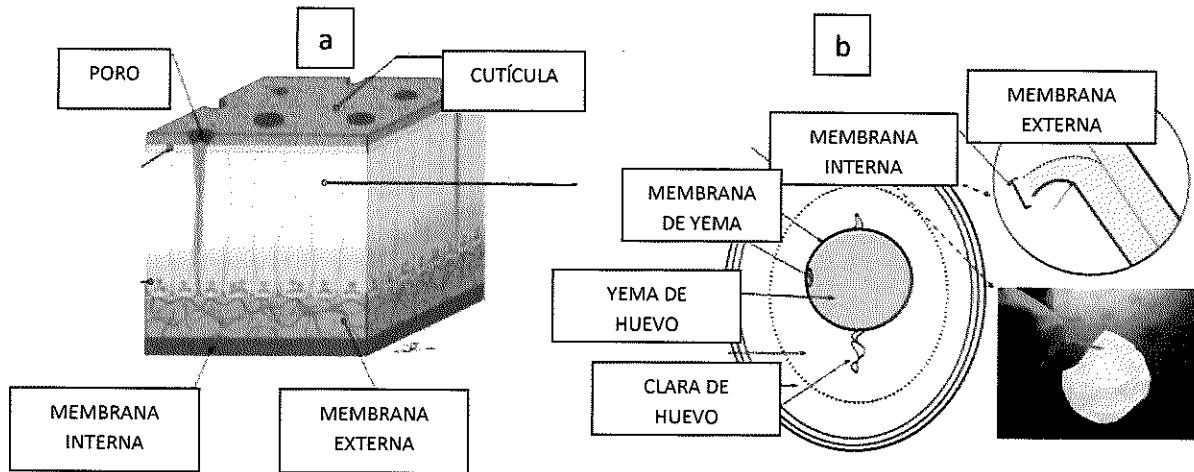


Figura 1. (a) Corte longitudinal y (b) coronal de huevo de gallina para representar el contenido interno. (Hincke 2012)

En las cutículas de huevos incubadas se ha observado mayor cantidad de proteínas que las cutículas de huevo no incubadas, como la ovoalbúmina, ovomucoide, ovocleidina-116 y la lisozima, que son inherentes al proteoma del huevo. Además de proteínas estructurales como queratina, colágeno, decorina, lumican y tropomiosina y proteínas del citoesqueleto, como actina, tubulina, vimentina. También contienen enzimas similares como inhibidoras de la proteasas y proteínas de señalización. Sin embargo, cuando son incubadas presentan varias proteínas asociadas con la glucólisis, carbohidratos, proteínas y metabolismos de los ácidos nucleicos.⁸

Es importante mencionar que la aplicación de estos andamios de cutícula de huevo pueden provocar reacciones alérgicas. La alergia al huevo de gallina es considerada la segunda alergia alimentaria más común en los bebés y niños pequeños después de la leche de vaca. Un reciente metaanálisis de la prevalencia de la alergia alimentaria estimó que la alergia al huevo afecta solo del 0.5% al 2.5% de los infantes⁹. Los datos de prevalencia de hipersensibilidad alimentaria en América del Sur son escasos. La frecuencia de alergia alimentaria reportada en las consultas médicas en Monterrey, México fue de 2.7%, con 51% de los pacientes menores de 5 años.^{9,10}

Una de las soluciones más importantes en el tratamiento de fisuras nasopalatales en pacientes con labio y paladar hendido, es el uso de factores de crecimiento,

apoyados por la ingeniería de tejidos, y ha utilizado además la proteína morfogenética para acelerar la regeneración ósea.¹¹

En la década de los 70's se hizo énfasis sobre la importancia en la reconstrucción de las fisuras nasoalveolares «Injertos óseos en hendiduras alveolares y palatinas» en pacientes con labio y paladar hendido por los cirujanos Boyne y Sands en 1972, en donde se reafirman los conceptos de la reconstrucción de fisuras nasoalveolares y se da a conocer una técnica que permite, entre otras ventajas, un adecuado cierre del piso nasal debido a la disección de la mucosa nasal de la bucal, así mismo la aplicación de un volumen más considerable de tejido óseo logrando una mejor expectativa hacia los objetivos de los injertos nasoalveolares.^{11,12}

A pesar de que se han encontrado en la literatura, diversos estudios sobre regeneración ósea en fisuras nasoalveolares en pacientes con labio y paladar hendido, utilizando proteína morfogenética^{11,13} e injertos autólogos primordialmente de cresta iliaca, no ha habido estudios referentes a utilización de andamios en ingeniería de tejidos para reconstrucción de fisuras nasoalveolares.

El reto hoy en día es construir andamios que mimeticen la complejidad de la arquitectura de los tejidos. Por lo cual en esta investigación se busca la fabricación de andamios óseos descelularizados como método para corrección de fisuras nasoalveolares en pacientes con secuela de labio y paladar hendido.

II. Materiales y métodos

Esta investigación es de tipo experimental y comparativo. Fue realizado en el Servicio de Biología del Desarrollo del Hospital Infantil de México Federico Gómez en colaboración con el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Química y el Laboratorio de Biomateriales Dentales de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para poder extraer cutículas con características de investigación se inició con la incubación de los huevos de gallina, la obtención de las cutículas y la descelularización. El universo de estudio consistió en 33 muestras. Se incluyeron como grupo control A1: que consistió de 4 cutículas de huevo de gallina con un periodo de incubación de 10 días sin tratamiento, grupo A2: 4 cutículas de huevo de gallina con un periodo de incubación de 18 días sin tratamiento, grupo B1: 3 cutículas de huevo de gallina con un periodo de incubación de 10 días con el protocolo 1 de descelularización, el grupo B2: fueron 3 cutículas de huevo de gallina con un periodo de incubación de 18 días con el protocolo 1 de descelularización, el grupo C1: consistió en 3 muestras de cutículas de huevo de gallina con un periodo de incubación de 10 días con el protocolo 2 de descelularización, el grupo C2: fueron 3 cutículas de huevo de

gallina con un periodo de incubación de 18 días con el protocolo 2 de descelularización, grupo D1: consistió en 4 cutículas de huevo de gallina con un periodo de incubación de 10 días con el protocolo 3 de descelularización y el grupo D2: consistió de 4 cutículas de huevo de gallina con un periodo de incubación de 18 días con el protocolo 3 de descelularización.

Para el grupo E: las pruebas de resistencia a la tracción se realizaron con la máquina universal de pruebas Instron serie 5567, Bluehill 1, USA (figura 2) para observar la capacidad elástica y plástica de las cutículas. Solo se incluyeron 5 cutículas de huevo de gallina nativa de 30 mm de largo por 10 mm de ancho, medidos con un vernier (Mitutoyo, Japan).



Figura 2. Vista frontal máquina universal de pruebas (Instron serie 5567, Bluehill 1, USA).

Para eliminar la mayor cantidad de proteínas de bajo peso molecular y dejar solamente las que constituyen las fibras, se procedió a la descelularización. En este estudio se utilizaron tres protocolos de descelularización, con la finalidad de encontrar el método que garantice la remoción de material orgánico sin dañar la matriz extracelular, para que conserve sus propiedades mecánicas y biológicas que la hagan apta para ser utilizada como un andamio biológico. Las membranas se cortaron en pedazos de aproximadamente 15 mm lo más regular que lo permitió la muestra y se colocaron en cajas de Petri (Figura 3) de vidrio para ser procesadas según los protocolos que se describen enseguida.

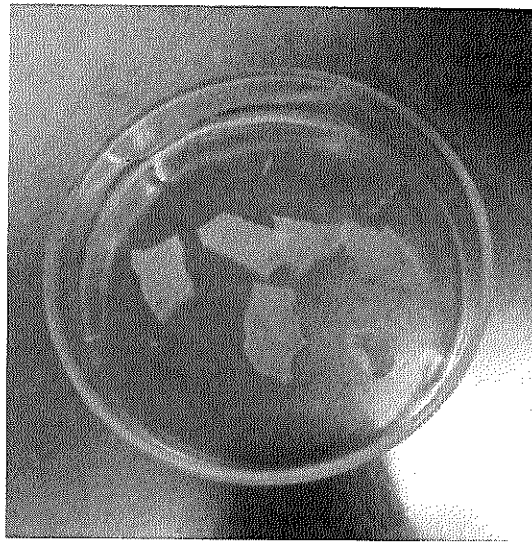


Figura 3. Fragmentos de cutícula de huevo de gallina de aproximadamente 15 mm colocadas en cajas de Petri de vidrio para ser descelularizadas.

El protocolo 1 (P-1) se realizó de acuerdo con lo reportado por Pillai y colaboradores en 2017. Las muestras de cutícula de huevo de gallina se lavaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) con 20 ml de PBS, sobre un agitador orbital (100 rpm). Se retiró el PBS y se agregó isopropanol (20 ml/10 minutos/TA). Se eliminó el isopropanol y se lavó nuevamente con PBS (20 ml/10 minutos/TA). Las cajas Petri se destaparon y se colocaron dentro de una campana de flujo laminar para la exposición a luz ultravioleta durante 20 minutos. Finalmente, se esterilizaron por autoclave (121°C/15 lb/20 minutos). Terminado el tratamiento las membranas se colocaron en viales con agua destilada estéril para su posterior análisis.¹⁴

El protocolo 2 (P-2) se realizó según lo reportado por Gardin y colaboradores en 2015, las muestras de cutículas se lavaron con PBS (20 ml/10 minutos/TA), se retiró el PBS y las membranas se pasaron a tubos de polipropileno de 50 ml, se agregó agua destilada y se realizaron 4 ciclos de choque térmico (16 horas a -70°C/20 minutos a ebullición), cambiando el agua destilada en cada ciclo. Posterior al choque térmico, se realizó un lavado con Tritón X-114 al 1% durante 8 horas a TA, seguido de un lavado con Tritón X-114 al 0.1% durante 16 horas a TA. Finalmente 3 lavados con agua destilada para eliminar cualquier traza de detergente.¹⁵

El protocolo 3 (P-3) se realizó según lo reportado por Mallis y colaboradores en 2017. Las cutículas se lavaron con PBS (20 ml/10 minutos/TA) en cajas Petri. Posteriormente se realizó un lavado buffer (CHAPS 8mM, NaCl 1M, y EDTA25 mM) en PBS (10 ml/22 horas/TA). Posteriormente se lavaron las cutículas con PBS (20 ml/10 minutos/TA) y se continuó con un lavado en buffer (SDS1.8 mM, NaCl1 M, y EDTA25 mM) en PBS (20 ml/22 hrs/TA). Para eliminar el detergente

residual, se realizaron 6 ciclos de lavado durante 2 días con 20 ml de PBS. Finalmente, las membranas se colocaron en viales con agua bidestilada.¹⁶

Todas las muestras fueron observadas mediante microscopio electrónico de barrido (MEB JEOL JSM 7600F, USA) para el estudio de pruebas morfológicas de los andamios. El contenido de ADN se midió para pruebas de biocompatibilidad. Se utilizaron fragmentos de cutícula sin tratamiento como grupo control y cutículas tratadas con cada protocolo de descelularización. La membrana se transfirió a un microtubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregó un buffer de extracción Z (Tris-HCl 0.20 M, de NaCl 0.25M, EDTA 0.025 M y SDS 0.5%) 300 µl y se dejó a TA 10 minutos agitando con vórtex cada 3 minutos para permitir el rompimiento del tejido. Se agregó un volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1) mezclando con vórtex y dejando en incubación durante 10 minutos a TA, las muestras se centrifugaron (10,000 x G/10 minutos/4°C) y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo, se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló por inversión, se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos y repitió el paso de centrifugación. La pastilla se lavó con etanol al 70% procediendo a un nuevo paso de centrifugación, se eliminó el etanol residual por evaporación a TA y el pellet se disolvió con 30 µl de agua libre de ARNasas y ADNasas. Las muestras se analizaron por un gel de agarosa al 1%, utilizando 10 µl de cada muestra, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador con luz UV.

Para medir la cantidad de proteínas de alto y bajo peso molecular pre y post tratamiento de descelularización, se utilizó un fragmento de cada una de las muestras, la membrana se pasó a un microtubo de 1.5 ml y se agregaron 300 µl de buffer de extracción (Tris – HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 10 mM, 1 mM, DTT1mM, SDS 1% y glicerol 5%). Las muestras se incubaron a 50°C durante 10 minutos y posteriormente se sonicaron en un sonicador-misonix 3000 con pulsos de 10 segundos, por 6 ocasiones. El sobrenadante se separó por centrifugación a 14,000 rpm/10 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 280 nm para normalizar las muestras a una misma absorbancia y se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% para la observación de proteínas, tiñendo el gel con reactivo de Coomasie.

Las pruebas de espectroscopía infrarroja (IFTR) se realizaron para confirmar que no hubiera presencia de elementos tóxicos, se incluyeron 2 muestras control de 10 días de incubación y otra de 18 días de incubación. Estas últimas fueron comparadas con 2 cutículas de 10 y 18 días de incubación, sometidas al protocolo 3 de descelularización. Solamente se evaluó la presencia de residuos del protocolo 3 (P-3) de descelularización.

En la (tabla 1) se presenta la distribución de las cutículas sometidas a las diferentes pruebas de acuerdo al tiempo de incubación.

Tabla 1. Distribución de las pruebas a las que fueron sometidas las cutículas de huevo de acuerdo al tratamiento y tiempo de incubación. Hospital Infantil Federico Gómez 2019.

Tiempo de incubación	Sin tratamiento (control)	Detergente 1	Detergente 2	Detergente 3	NUMERO PRUEBAS
Sin incubación	Pruebas mecánicas (Resistencia traccional) INSTRON				5
10 días de incubación	MEB DNA PROTEINAS INFRARROJO	MEB DNA PROTEINAS	MEB DNA PROTEINAS	MEB DNA PROTEINAS INFRARROJO	14
18 días de incubación	MEB DNA PROTEINAS INFRARROJO	MEB DNA PROTEINAS	MEB DNA PROTEINAS	MEB DNA PROTEINAS INFRARROJO	14
TOTAL					33

Fuente: propia

III. Resultados

En las pruebas con el MEB se pudo observar que la cara interna (cóncavo) de la cutícula de huevo de 10 días de incubación sin tratamiento de descelularización (figura 4A), la membrana tiene diversas capas. Las fibras presentan una superficie rugosa, se encuentran orientadas de forma aleatoria con un grosor entre 1 a 5 μm , la longitud de las fibras son largas, los poros de diferentes diámetros, algunos pueden ir desde menos de 1 μm hasta 50 μm y sobre algunas de las fibras se observan nódulos orgánicos agrupados de 10 a 20 μm . En el lado externo (convexo) de la cutícula, se aprecia una superficie rugosa, con diferentes estructuras globulares de 1 a 2 μm , no se observan poros en su superficie y se encuentra mayormente mineralizada a diferencia de la capa interna (figura 4B). El grosor de la cutícula podemos apreciar, como se encuentra formado por toda la red de fibras que componen la cara interna de la cutícula, con un grosor de 30 a 50 μm (figura 4C).

En la cara interna de la cutícula de huevo sin tratamiento y 18 días de incubación, observamos que las fibras se encuentran en capas, se disponen aleatoriamente y tienen un grosor de 5 a 20 μm , los poros se forman por el entrecruce de sus fibras, con un tamaño de 1 a 35 μm , son fibras largas y a lo largo de ellas se aprecian pequeñas estructuras globulares color blanquecino de 1 a 2 μm de diámetro. (figura 5A). En la cara externa se observa una superficie lisa, mineralizada y que limita el entrelazado de las fibras que componen el grosor de la cutícula (figura 5B). El grosor es de 40 μm y se compone de las diferentes capas de fibras de la cara interna (figura 5C). La cara interna de la cutícula de 10 días de incubación

con el protocolo 1 de descelularización (figura 6A) es una superficie irregular, con las fibras dispuestas aleatoriamente en capas, son fibras largas, con un grosor de 1 a 50 μm , éstas presentan pocos nódulos blanquecinos en su superficie de 1 a 2 μm y en algunas de sus fibras se observan placas orgánicas de color oscuro. El entrecruce de estas fibras forman poros de 1 a 30 μm . En la cara interna de la cutícula de 18 días de incubación con el protocolo 1 de descelularización (figura 6B) se observan fibras muy simétricas tanto en longitud y grosor (2 a 6 μm), estas fibras forman varias capas y presentan nódulos blancos aislados a lo largo de las superficies, los poros formados por el entrecruce de las fibras son de 1 a 50 μm . En la cutícula con 10 días de incubación sometida al protocolo 2 de descelularización (figura 7A) observamos en su cara interna fibras largas con un grosor de 2 a 10 μm , algunas de sus fibras se encuentran fusionadas y se distribuyen aleatoriamente formando placas, a lo largo de sus fibras se observan nódulos blanquecinos bien delimitados de 0.5 a 5 μm . Los poros formados por las fibras son de 1 hasta 100 μm . La cutícula de 18 días de incubación sometida al protocolo 2 de descelularización (figura 7B) se observó que las fibras de la cara interna tienen una superficie más plana formando placas fusionadas y tienen ciertos nódulos blanquecinos muy aislados de 1 a 3 μm . Los poros formados por las fibras son de 1 a 30 μm . En algunas de sus fibras se observan grosores de 50 μm y otras de 1 μm . En la cara interna de la cutícula de 10 días de incubación sometida al protocolo 3 de descelularización (figura 8A) observamos fibras de 1 a 40 μm de grosor, se disponen aleatoriamente en capas. La superficie de las fibras tiene tanto fibras cilíndricas como fibras planas fusionadas, recubiertas por múltiples nódulos blanquecinos de .5 a 2 μm . Estas fibras forman los poros, que van de 1 a 50 μm . La cutícula de 18 días de incubación con el protocolo 3 de descelularización (figura 8B) contiene fibras largas, distribuidas aleatoriamente en capas. La superficie de sus fibras son lisas casi en su totalidad, teniendo ciertos nódulos blanquecinos aislados de 0.5 a 10 μm de diámetro. Son fibras de 1 a 10 μm de grosor y estas forman poros de 1 a 100 μm .

Sin tratamiento. 10 días de incubación



Figura 4. A) Lado cóncavo de la membrana, B) Lado convexo, C) Grosor de membrana

Sin tratamiento. 18 días de incubación

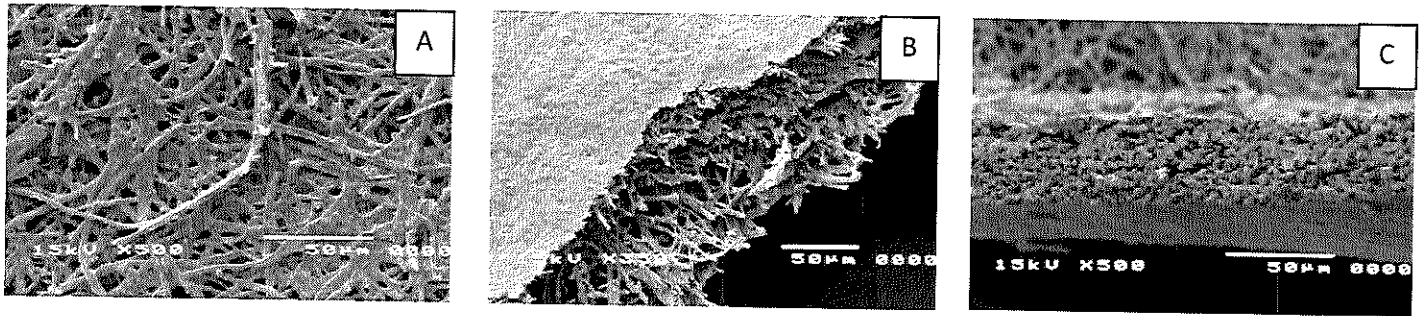


Figura 5. A) Lado cóncavo de la membrana, B) Lado convexo, C) Grosor de membrana

Con tratamiento. Protocolo 1 de descelularización

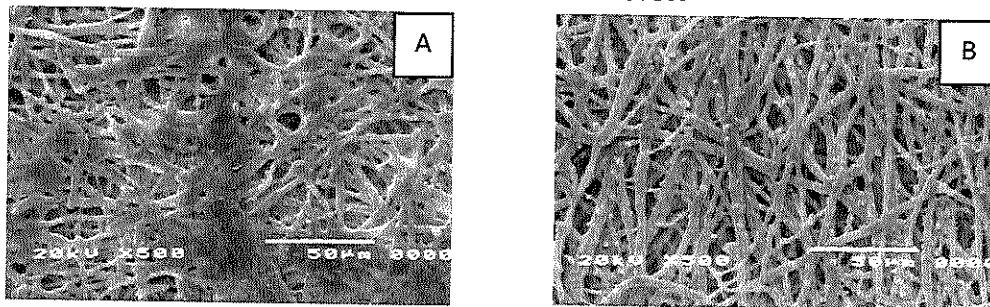


Figura 6. A) 10 días de incubación, B) 18 días de incubación

Con tratamiento. Protocolo 2 de descelularización

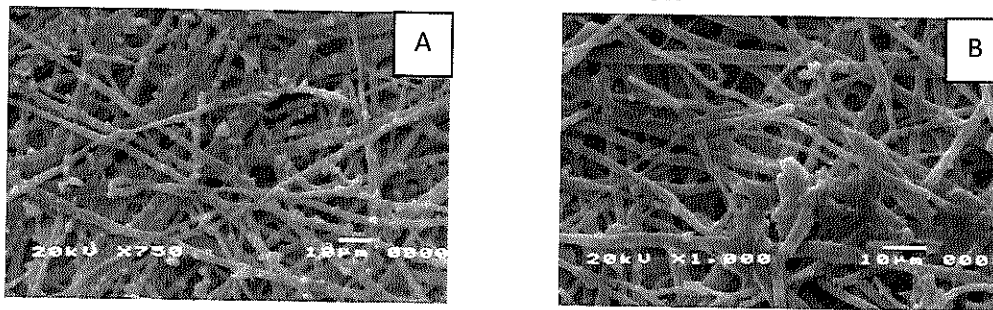


Figura 7. A) 10 días de incubación, B) 18 días de incubación

Con tratamiento. Protocolo 3 de descelularización

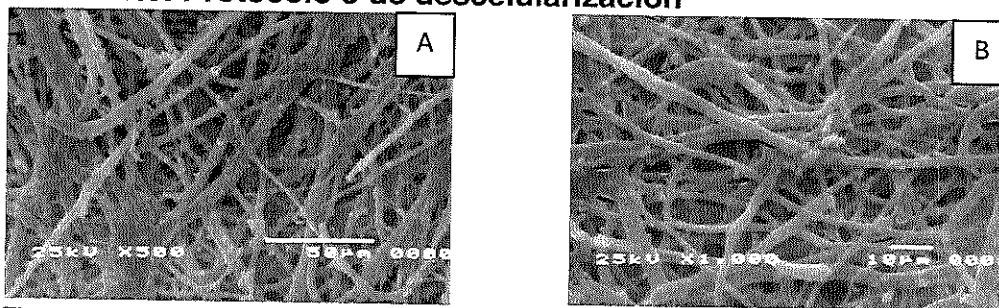


Figura 8. A) 10 días de incubación, B) 18 días de incubación

La eficacia de los 3 protocolos utilizados para la descelularización de las membranas de huevo se observó mediante el análisis del ADN que permanece en la membrana. El ADN genómico es de alto peso molecular por lo que se debe observar una banda por arriba de los 10,000 pares de bases (pb). En la figura 9A se puede observar que se realizó una adecuada extracción de material genético, dado que en varias muestras se puede apreciar la banda de alto peso molecular. En la muestra de 10 días de incubación sin tratamiento (S/T) no se observa una banda de alto PM, sin embargo, se puede observar un barrido por debajo de los 300 pb, lo cual indicaría la presencia de ARN o bien el ADN se degradó. En las muestras de 10 y 18 días de incubación tratadas con los P-2 y P-3 se observa la presencia de una banda de alto peso molecular, lo cual es indicativo de ADN genómico. Finalmente se observa que en las muestras tanto de 10 como de 18 días de incubación, sometidas al P-1 no se observa ninguna banda de alto peso molecular y tampoco se observa el barrido por debajo de los 300 bp, lo que nos indica que este protocolo logró eliminar la presencia de material genético en las muestras.

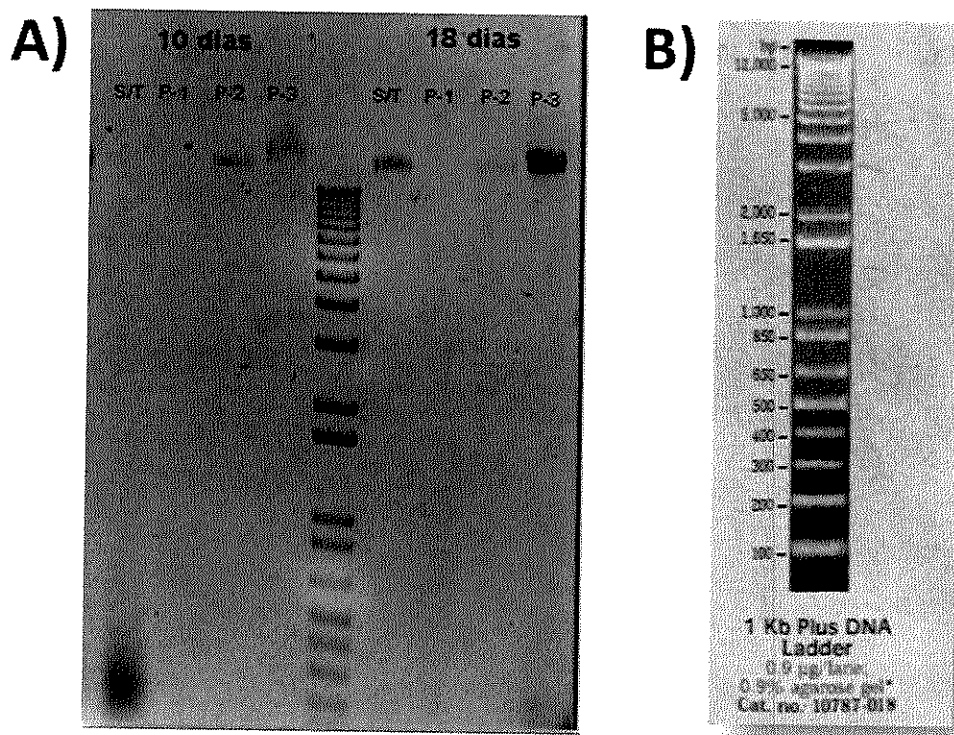


Figura 9. Observación del contenido de ADN en diferentes muestras de membranas de huevo mediante un gel de agarosa. A) se observa la presencia de ADN genómico en las muestras de 10 y 18 días de incubación tratadas con los protocolos de descelularización 2 y 3 (P-2 y P-3) así como en la muestra de 18 días de incubación sin tratamiento (S/T). Las muestras tratadas con el protocolo 1 (P-1) no contienen ADN genómico visible. B) Marcador de peso molecular utilizado como referencia.

La presencia de proteínas en las membranas de huevo que fueron sometidas a procesos de descelularización se observó mediante un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En la figura 10A, se observa que se pudieron extraer proteínas tanto de alto peso molecular, por arriba de los 75 kDa así como de bajo peso molecular, por debajo de los 25 kDa. Se observa claramente la presencia de estas bandas en las muestras sin tratamiento (S/T) y en las muestras tratadas con el protocolo 3 (P-3). Las proteínas de bajo peso molecular no son visibles cuando las membranas se trataron con los protocolos 2 y 3, pero siguen siendo visibles las proteínas de alto peso molecular, lo cual es indicativo que estos protocolos degradan las proteínas de bajo peso molecular.

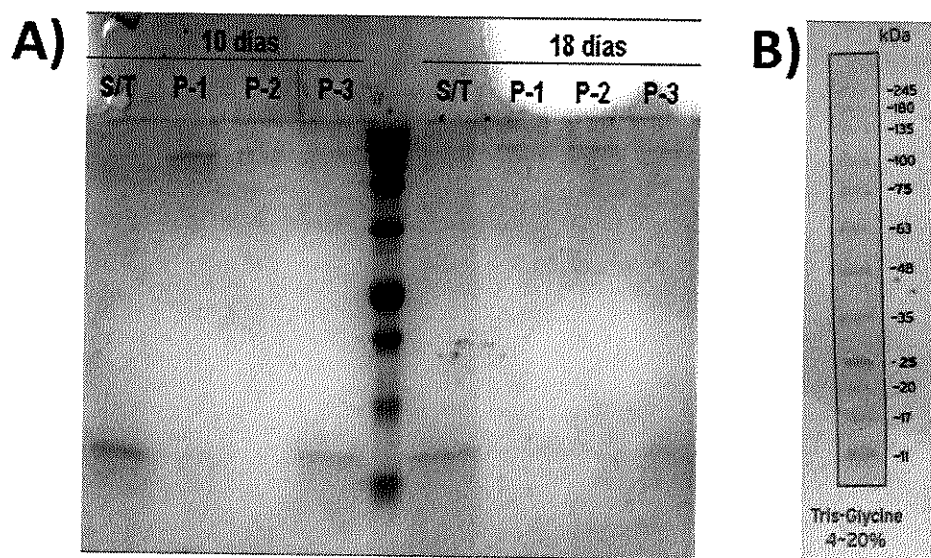


Figura 10. Observación de proteínas en SDS-PAGE. A) gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomasie, se observan las muestras de membranas con 10 y 18 días de incubación así como las muestras sin tratamiento (S/T) y tratadas con los protocolos de descelularización 1, 2 y 3 (P-1, P-2 y P-3), es notoria la presencia de proteínas de alto peso molecular, por arriba de los 75 KDa en todas las muestras analizadas y de bajo peso molecular, por debajo de los 25 kDa en las muestras S/T y tratadas con el P-3. B) Marcador de peso molecular que se utilizó como referencia.

En las pruebas de resistencia a la tracción se obtuvieron los datos de las cutículas sin incubación y ningún tratamiento de descelularización (nativas). Mostraron una fuerza de 3.4 N, una tensión máxima promedio de 1.2 MPa y el módulo de elasticidad promedio de 3.33 MPa.

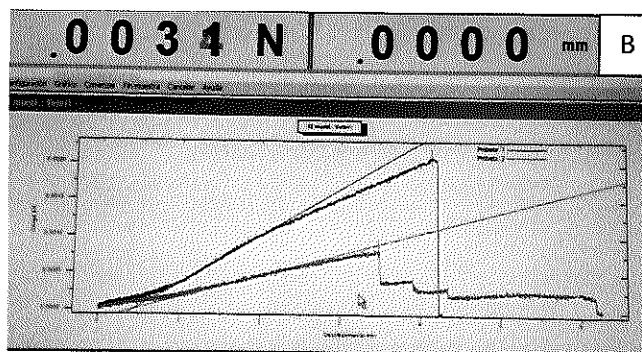
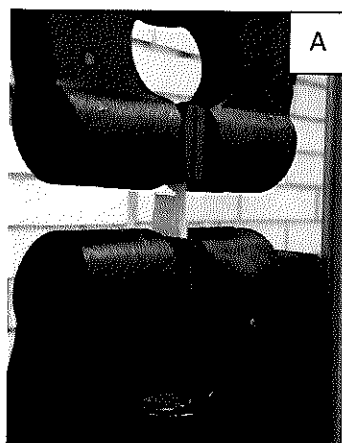


Figura 11. A) Se observa como las mordazas sujetan la cutícula de cáscara de huevo en su momento de ruptura. B) Carga y tensión máxima, módulo de elasticidad.

De acuerdo al estudio de espectroscopía infrarroja (IFTR) utilizada para encontrar residuos del detergente del P-3, se encontró que tanto la cutícula de 10 días como de 18 días de incubación presentaron residuos del detergente, a pesar de que se realizaron 6 ciclos de lavados durante 2 días con PBS (Figura 12). Por lo cual es importante verificar que todos los elementos químicos de los detergentes sean eliminados.

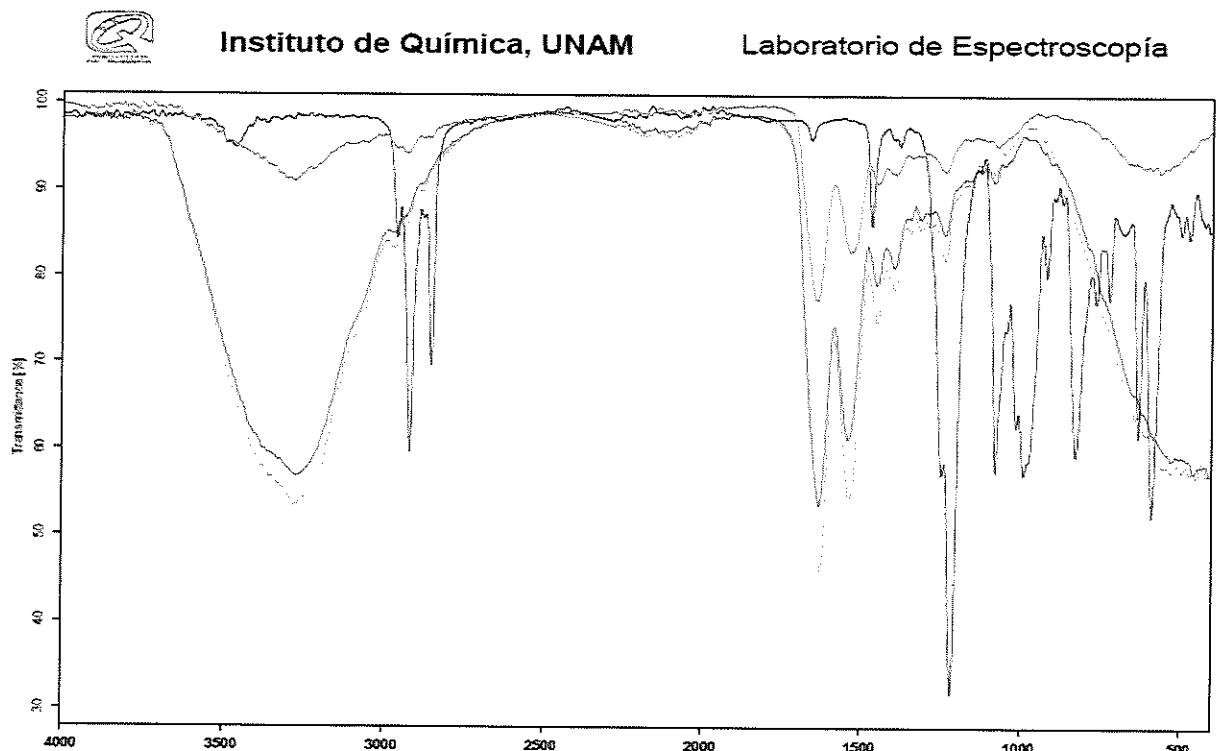


Figura 12. Línea verde. Grupo control, Línea roja. SDS, Línea púrpura. Cutícula de 18 días de incubación, sometida al P-3 de descelularización, Línea azul. Cutícula de 10 días de incubación, sometida al P-3 de descelularización.

IV. Discusión

En los estudios que se realizaron con el MEB entre las cutículas sin tratamiento y las cutículas sometidas a los 3 protocolos de descelularización encontramos que las cutículas sin tratamiento presentan mayor cantidad de proteínas a lo largo de sus fibras, lo que pudiera impedir la proliferación de células mesenquimatosas. Sin embargo en las cutículas con los diferentes protocolos de descelularización se observaron menor cantidad de estas proteínas de bajo peso molecular, coincidiendo con Pillai-2017, Gardin-2015 y Mallis-2017.^{14,15,16}

Pudimos observar que las cutículas con mayor periodo de incubación tenían mayor cantidad de proteínas al igual que la anchura y grosor de sus fibras. Similar a los hallazgos de Rath en 2016. El cual encontró que las cutículas de huevo de gallina incubadas contienen proteínas estructurales, entre las más importantes: queratina, colágeno y proteínas del citoesqueleto. También algunas otras asociadas con la glucólisis y metabolismos de los ácidos nucleicos.¹⁷ Si comparamos los resultados del autor con lo que encontramos en nuestros resultados de extracción de proteínas, coincidimos en que la mayor cantidad de proteínas fueron de alto peso molecular en las cutículas de 18 días de incubación en los 3 protocolos de descelularización.

Pillai en 2017 mostró que las cutículas colocadas en autoclave presentaban menor cantidad de ADN genómico que las cutículas nativas sin ningún tratamiento, lo cual coincide con nuestros hallazgos debido a que nuestras cutículas sometidas al P-1¹⁴ no presentaron ADN genómico a diferencia de los protocolos de descelularización P-2 y P-3, que si presentaron.

Por otra parte Kamegai y colaboradores en 2005 observaron que en niños de 3 a 5 años de edad la fuerza de masticación media fue de 186.2 N en niños y 203.4 N en niñas, mientras que Maeda y colaboradores encontraron valores de 212.16 N en este rango de edad. Para Rentes y colaboradores, el valor medio fue 213.17 N en niños de 3 a 5.5 años de edad con oclusión normal.^{18,19,20}

Nuestros resultados obtenidos en las pruebas mecánicas de resistencia a la tracción, específicamente el módulo de elasticidad permite inferir que las cutículas de gallina utilizadas en este estudio podrían ser utilizadas como andamios para la futura regeneración ósea de fisuras nasoalveolares en pacientes con labio y paladar hendido, tomando en cuenta que posteriormente se deben de realizar pruebas de resistencia a los andamios óseos con cultivos celulares. A pesar de que el tamaño de la muestra fue limitado ya tenemos un parámetro de referencia de la resistencia a la tracción únicamente de los andamios, pero es conveniente crear una línea de investigación para comparar las cutículas ya cargadas con los cultivos celulares.

V. Conclusiones

1. Todas las cutículas de huevo de gallina presentaron poros y fibras de tamaños y formas adecuadas para utilizarlas como andamio o soporte de las células que se podrán utilizar en la regeneración ósea en pacientes con labio y paladar hendido. Además el tamaño de las fibras de las cutículas de 18 días de incubación mostraron mayor grosor, fusionándose y formando placas.
2. De acuerdo a las características físicas de las cutículas de huevo de gallina sin tratamiento, se observó que presentaron mayor cantidad de proteínas de bajo peso molecular, lo que no permiten el crecimiento adecuado celular y pudieran provocar reacciones alérgicas en el paciente. Las cutículas de 10 días de incubación presentaron ARN y proteínas de alto y bajo peso molecular y las cutículas de 18 días de incubación presentaron ADN y proteínas de alto y bajo peso molecular.
3. Se descartó el (P-2) de descelularización debido a que el tiempo de elaboración era prolongado y además mostró alta cantidad de ADN y proteínas de alto y bajo peso molecular.
4. Se descartó el (P-3) de descelularización debido a que fue el protocolo con mayor cantidad de ADN genómico y proteínas de alto y bajo peso molecular.
5. Se realizaron las pruebas de resistencia a la tracción en cutículas de huevo de gallina nativas sin ningún tratamiento, cuyo resultado fue de 300 gramos de fuerza, suficiente para soportar la carga celular para la regeneración de tejidos.
6. De acuerdo a los resultados de espectroscopia infrarroja del (P-3), consideramos importante verificar que no quede ningún residuo químico durante los procedimientos de descelularización, porque a pesar de que se realicen muchos ciclos de lavado, no garantiza que se elimine el total de los residuos de detergente.
7. Las cutículas sometidas a tratamiento con isopropanol (P-1), fue el único tratamiento que no presento ADN genómico y las proteínas fueron de alto peso molecular, manteniendo su matriz extracelular. Además fue el protocolo más eficiente en cuanto a tiempo y sencillez de elaboración. Por lo que se sugiere utilizar este andamio con dicho protocolo.

VI. Agradecimientos

Agradezco al Dr. Joaquín Canseco, coordinador del posgrado de la especialidad de ortodoncia del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Agradezco a las doctoras Laura Vargas Ulloa, Margarita García Garduño y Paulina Ramírez del Laboratorio de Biomateriales Dentales de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a la doctora Patricia Cano Sánchez del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a la Dra. Concepción Sánchez Gómez y al Dr. Ricardo Jaime Cruz del servicio de Biología del Desarrollo del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Agradezco a la QFB. María del Rocio Patiño Maya del Laboratorio de Espectroscopia y Polarimetría del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

VII. Referencias

1. Gómez-Lizárraga KK, Flores-Morales C, Del Prado-Audelo ML, Álvarez-Pérez MA, Piña-Barba MC, Escobedo C. Polycaprolactone- and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioploted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. *J. 2017;79:326–35.*
2. INBIB. Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa. Nih 2013
3. Alfarano C, Lairez O, Calise D, Bourin P, et al. Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. *2014;10(2):901–11.*
4. Gómez-Lizárraga KK, Flores-Morales C, Del Prado-Audelo ML, Álvarez-Pérez MA, Piña-Barba MC, Escobedo C. Polycaprolactone- and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioploted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. *J. 2017; 79:326–35.*
5. Hunsberger J, Harrysson O, Shirwaiker R, Starly B, Wysk R, Cohen P, et al. Manufacturing road map for tissue engineering and regenerative medicine technologies. *Stem Cells Transl Med. 2015;4(2):130–5.*
6. ISO 10993-5:2009, Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
7. F. Yi, Z. X. Guo, L. X. Zhang, J. Yu, Q. Li, *Biomaterials*, 2004, 25, 4591.
8. Rath, N. C., Liyanage, R., Makkar, S. K., & Lay, J. O. (2016). Protein profiles of hatchery egg shell membrane. *Proteome Science*, 15(1)
9. López Pérez G, Morfín Maciel BM, Huerta López J, López López J, Rivera Pérez JL, López Medina L. et al. Risk factors related to allergic diseases in Mexico city. *Rev Alerg Mex. 2010; 57:18–25.*
10. Rodríguez-Ortiz PG, Muñoz-Mendoza D, Arias-Cruz A, González-Díaz SN, Herrera-Castro D, Vidaurri-Ojeda AC. Epidemiological characteristics of patients with food allergy assisted at regional center of allergies and clinical immunology of Monterrey. *Revista alergía Mexico. 2009; 56:185–191.*
11. Gupta C, Mehrotra D, Mohammad S, Khanna V, Kumar Singh G, Singh G, et al. Alveolar bone graft with Platelet Rich Plasma in cleft alveolus. *J Oral Biol Craniofacial Res 2013;3(1):3–8.*
12. Montaña López A, Rincon Rodríguez H, Landa Solís C. Grado de integración de injertos óseos nasoalveolares, en pacientes con secuelas de labio y paladar fi surados. *Rev Odontol Mex. 2012; 16(1):18–30.*
13. Giudice G, Cutrignelli DA, Leuzzi S, Robusto F, Sportelli P, Nacchiero E. Autologous bone grafting with platelet-rich plasma for alveolar cleft repair in patient with cleft and palate. *Ann Ital Chir. 2016; 87(1):5–12.*
14. Pillai MM, Akshaya TR, Elakkiya V, Gopinathan J, Sahanand KS, Rai BKD, et al. Egg shell membrane-a potential natural scaffold for human meniscal tissue engineering: An in vitro study. *RSC Adv. 2015; 5(93):76019–25.*
15. Gardin C, Ricci S, Ferroni L, Guazzo R, Sbricoli L, De Benedictis G, Finotti L, Isola M, Bressan E and Zavan B. Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures. *PLOS one 2015;10(7)e0132344.*
16. P. Mallis et al. / Histological and biomechanical characterization of decellularized porcine pericardium, *Bio-Medical Materials and Engineering 28 (2017) 477–488.*
17. Rath, N. C., Liyanage, R., Makkar, S. K., & Lay, J. O. (2016). Protein profiles of hatchery egg shell membrane. *Proteome Science*, 15(1)

18. Kamegai T, Tatsuki T, Nagano H, Mitsunashi H, Kumeta J, Tatsuki Y et al. A determination of bite force in northern Japanese children. *Eur J Orthod.* 2005;27(1):53-7.
19. Maeda T, Imai U, Saito T, Higuchi N, Akasaka M. [Study on the feeding function and feeding behavior of children. 1. Biting pressure and masticatory efficiency for 3, 4 and 5 years old children] [Article in Japanese]. *Shoni Shikagaku Zasshi.* 1989;27(4):1002-9.
20. Rentes AM, Gavião MB, Amaral JR. Bite force determination in children with primary dentition. *J Oral Rehabil.* 2002;29(12):1174-80.
21. Juarez DE. Andamios por impresión 3d, con base en nano-hidroxiapatita y ácido poliláctico en la regeneración ósea; Síntesis y propiedades mecánicas. Instituto de investigaciones en materiales, Faculta de Química, UNAM 2018
22. Marcos Sabino, Loaiza Marielys, DernowsekJanaína, Rezende Rodrigo JDS. Técnicas Para La Fabricación De Andamios Poliméricos Con Aplicaciones En Ingeniería De Tejidos. *RevLatMet.* 2017; 37(2):120–46.
23. Ceccaldi C, Bushkalova R, Alfarano C, Lairez O, Calise D, Bourin P, et al. Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. 2014;10(2):901–11
24. Bhattacharjee P, Kundu B, Naskar D, Kim HW, Maiti TK, Bhattacharya D, et al. Silkscaffolds in bonetissueengineering: Anoverview. 2017; 63:1–17.
25. Luckanagul JA, Metavarayuth K, Feng S, Maneesaay P, Clark AY, Yang X, et al. Tobacco Mosaic Virus Functionalized Alginate Hydrogel Scaffolds for Bone Regeneration in Rats with Cranial Defect. *ACS BiomaterSci Eng.* 2016; 2(4):606–15.
26. Tedderetal., StabilizedCollagenScaffoldsfor Heart Valve TissueEngineering, *TISSUE ENGINEERING: Part A Volume 15, Number 6, 2009*
27. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep.* 2013; 2(June):1.
28. R. C. Thomson, M. C. Wake, M. J. Yaszemski and a. GM. Biodegradable Polymer Scaffolds to Regenerate Organs. *AdvPolymSci.* 1995; 122:247–77.
29. Green MR and Sambrook J. *Molecular Cloning: Laboratory Manual, Fourth Edition.* Cold Spring Harbor 2012.
30. Rodríguez-Fuentes N, Rodríguez-Hernández AG, Enríquez-Jiménez J, Alcántara-Quintana LE, Fuentes-Mera L, Piña-Barba MC, et al. Nukbone® promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *BiochemBiophys Res Commun.* 2013;434(3):676–80.
31. Fullana G, Biomimetic C. Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO) To cite this version : and treatment. 2012;423(ii):26–36.
32. Iwai S, Shimizu H, Suzawa Y, Akashi M, Yura Y. Hydroxyapatite agarose composite gels as a biochemical material for the repair of alveolar bone defects due to cleft lip and palate. *J Oral MaxillofacSurgery, MedPathol.* 2015;27(5):637–44.
33. Zhang XF, Wang YY, Ortiz L, Mao X, Jiang ZL, et al. Effects of hydroxyapatite-containing composite nanofibers on osteogenesis of mesenchymal stem cells in vitro and bone regeneration in vivo. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(2):319–30.
34. Alfarano C, Lairez O, Calise D, Bourin P, et al. Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment.. 2014;10(2):901–11.
35. Luckanagul JA, Metavarayuth K, Feng S, Maneesaay P, Clark AY, Yang X, et al. Tobacco Mosaic Virus Functionalized Alginate Hydrogel Scaffolds for Bone Regeneration in Rats with Cranial Defect. *ACS BiomaterSci Eng.* 2016;2(4):606–15.
36. Kim B-S, Mooney (1998)DJ. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 41: 322–332.
37. Harris LD, Kim B-S, Mooney DJ. *J. Biomed Mater Res.* 1998; 42: 396-402.

38. Hidalgo IA, Sojo F, Arvelo F, Sabino MA. *Molecular and Cellular Biomechanics*. 2013;10(2): 85- 105.
39. Thomson RC, Wake MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. *Advances in Polymer Science*. 2005; (122): 245-274.
40. Vieira JN, Posada JJ, Rezende RA, Sabino MA. *Materials Science and Eng C*. 2014; 37: 20-27.
41. Cerda-cristerna BI. Poly(lactide-co-glicolide) microspheres for controlled release of biomolecules: Concepts, applications and perspectives in Dentistry. *Adm*. 2013;LXX(1):6–11.
42. Cáneva AO, Víctor FM, Schächter S. *Historia Del Reemplazo Total De Cadera*. 1945;10.
43. Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-primer):S470–5.
44. T. H. Reinert, G. Jundt, *Histochem. Cell. Biol.*, 1999, 112, 271.
45. C. Y. Yeung, H. C. Lee, S. P. Lin, Y. C. Yang, F. Y. Huang, C. K. Chuang, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2006, 60, 136
46. Jia, J., Duan, Y., Yu, J., & Lu, J. (2008). Preparation and immobilization of soluble eggshell membrane protein on the electrospun nanofibers to enhance cell adhesion and growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86A(2), 364–373.